

# **Direkte Hemmung ATP-sensitiver Kaliumkanäle der pankreatischen B-Zelle durch Monokarbonsäuren**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von  
**Henrike Schmeling**  
aus  
**Herford**

1. Referent:	Prof. Dr. med. U. Panten
2. Referent:	Prof. Dr. med. S. Lenzen
eingereicht am:	4.12.2003
mündliche Prüfung (Disputation) am:	20.2.2004
Druckjahr:	2004

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Tagungsbeiträge:

SCHMELING H, ZÜNKLER BJ, PANTEN, U: Wirkung von  $\alpha$ -Ketomonocarbonsäuren auf ATP-empfindliche Kaliumkanäle (Kurzvortrag). 7. Deutscher Inselworkshop der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Münster, Dezember 2001.

SCHMELING H, ZÜNKLER BJ, PANTEN, U:  $\alpha$ -Keto-monocarboxylic acids directly inhibit ATP-sensitive  $K^+$ -channels (Kurzvortrag). *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 110 (Suppl. 1): S2, V005. 46. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Göttingen, Februar-März 2002.

HASTEDT K, SCHMELING H, ZÜNKLER BJ, PANTEN U: Mechanism of insulin-releasing action of  $\alpha$ -ketomonocarboxylic acids (Poster). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1): R71, 269. 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2002.

SCHMELING H, PANTEN U: Direct interaction of  $\alpha$ -Ketoisocaproic Acid and related compounds with Sulfonylurea receptors (Kurzvortrag). *Diabetes und Stoffwechsel* 11 (Suppl. 1): 21, V-46. 37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Dresden, Mai 2002.

SCHMELING H, URBAN KA, HASTEDT K, PANTEN U: Direct inhibition of  $K_{ATP}$ -channels in  $\beta$ -cells by  $\alpha$ -Ketomonocarboxylic acids (Poster). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367 (Suppl. 1): R75, 288. 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März 2003.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis November 2003 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. U. Panten danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung und die intensive, hilfreiche und stets freundliche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Besonders hervorheben und danken möchte ich Ines Thomsen, die mir das Patch Clampen beibrachte, Frau G. Wittenberg für die Bindungsexperimente, Herrn PD Dr. B. J. Zünkler für die Patch Clamp-Daten am  $K_{IR}6.2\Delta 26$  und Frau K. Urban für die Daten der Inselperifusion. Herzlichen Dank auch an das Technische Personal, Frau H. Arend, Frau H. Fürstenberg, Frau B. Pieper, Frau C. Rattunde, Frau B. Rummel, Frau C. Schulze und Frau I. Tunger für die ausgezeichnete Unterstützung in der Zellkultur und Tierhaltung.

Vielen, vielen Dank aber vor allem meinen lieben DoktorandenkollegInnen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig, die so viel zum tollen Arbeitsklima beigetragen haben!

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1	Definition und Therapie des Typ 2-Diabetes mellitus	3
1.2	Wirkmechanismus der Sulfonylharnstoffe und Analoga	5
1.3	Mechanismus der $\beta$ -zytotropen Wirkung von Glukose und anderen Nährstoffen	6
1.4	Nachteile der Sulfonylharnstoffe und Analoga	7
1.5	Bedarf an neuen Stimulatoren der Insulinsekretion	8
1.6	Hemmung des $K_{ATP}$ -Kanals durch KIC	9
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
3.1	Zellkultur und Transfektion von COS1-Zellen	11
3.1.1	Kultivierung, Passagierung und Kryokonservierung von COS-Zellen	11
3.1.2	Transformation und Plasmidpräparation	12
3.1.3	Transfektion und histologische Lac Z-Färbung	15
3.2	Isolierung von Maus-Pankreasinseln und Gewinnung von Einzelzellen	19
3.2.1	Basismedien für die Einzelzellisolierung	19
3.2.2	Versuchstiere	20
3.2.3	Durchführung der Inselisolierung und Einzelzellgewinnung	20
3.3	Patch Clamp-Experimente	21
3.3.1	Lösungen für die Messung von Einwärtsströmen am inside-out Patch	22
3.3.2	Lösungen für die Messung von Auswärtsströmen am inside-out Patch	24
3.3.3	Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes	26
3.3.4	Durchführung der Patch-Clamp Experimente	28
3.3.5	Auswertung der Patch-Clamp Experimente	30

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
4.1	Wirkung von Monokarbonsäuren auf $K_{ATP}$ -Kanäle des $K_{IR6.2}/SUR1$ - Typs in COS-Zellen	31
4.1.1	Einfluss der Ketosäuren auf die Einzelkanalstromamplitude	32
4.1.2	Kontrollexperimente zur Überprüfung des Versuchsprotokolls	33
4.1.3	Wirkungen von KIC, KC, IC, KIV, PPyr und PProp auf die $K_{ATP}$ - Kanalaktivität in COS-Zellen	34
4.2	Hemmung der $K_{ATP}$ -Kanalaktivität pankreatischer Maus-B-Zellen durch $\alpha$ -Ketomonokarbonsäuren	37
4.2.1	Einfluss auf die Einzelkanalstromamplitude	38
4.2.2	Maximalwirkung von Meglitinid in Anwesenheit von ADP (1 mM)	39
4.2.3	Konzentrations-Wirkungsbeziehung für KIC, KC, KIV und PPyr	40
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>42</b>
5.1	Patch Clamp-Experimente an Maus-B-Zellen	42
5.2	Monokarbonsäuren hemmen $K_{ATP}$ -Kanäle durch Bindung an SUR1	43
5.3	Struktur-Wirkungsbeziehung der Monokarbonsäuren	47
5.4	Bedeutung der direkten $K_{ATP}$ -Kanalhemmung durch Monokarbon- säuren für deren insulinfreisetzende Wirkung	48
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
	<b>Literatur</b>	<b>56</b>
	<b>Abkürzungen</b>	<b>67</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Therapie des Typ 2-Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Krankheit, die durch Störung des Kohlenhydrat-, Fett-, Protein- und Elektrolytstoffwechsels gekennzeichnet ist (Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft 2002, BRÜCKEL und KÖBBERLING, 2002). Diese pathophysiologischen Änderungen sind Folge unzureichender Sekretion und Wirkung von Insulin. Ein Diabetes mellitus liegt nach Definition der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft (ADA) dann vor, wenn die Plasmaglukosekonzentration im nüchternen Zustand 126 mg/dl beziehungsweise 7,0 mmol/l überschreitet, oder wenn sie 2 Stunden nach peroraler Einnahme von 75 g Glukose mehr als 200 mg/dl (11,1 mmol/l) beträgt (EXPERT COMMITTEE 1997). Ätiologisch wird der Diabetes mellitus in verschiedene Typen eingeteilt (Tabelle 1.1). Bei allen Diabetesformen ist heute das Hauptproblem, dass nach jahrelangem

<b>I. Typ 1 Diabetes</b>	(B-Zell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt) A. Immunologisch vermittelt B. Idiopathisch
<b>II. Typ 2 Diabetes</b>	(kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken)
<b>III. andere spezifische Diabetes-Typen</b>	A. genetische Defekte der B-Zell-Funktion B. Genetische Defekte der Insulinwirkung C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas D. Endokrinopathien E. Medikamenten- oder Chemikalien-induziert F. Infektionen G. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes H. andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome
<b>IV. Gestationsdiabetes</b>	

**Tabelle 1.1:** Einteilung des Diabetes mellitus (nach: EXPERT COMMITTEE 1997, ALBERTI et ZIMMET, 1998)

Verlauf Schädigungen der Blutgefäße als Spätschäden auftreten (HASSELBLATT und PANTEN 2001). Diese Spätschäden treten um so eher und schwerer auf, je schlechter der Diabetes mellitus behandelt wird. Die Gefäßschäden zeigen sich einerseits als Diabetes-spezifische Erkrankung der Blutkapillaren (Mikroangiopathie), die Niereninsuffizienz, Netzhautschäden des Auges und Polyneuropathie hervorruft. Andererseits bilden sich in den mittleren und großen Arterien atherosklerotische Veränderungen (Makroangiopathie), die nicht Diabetes-spezifisch sind. Die Makroangiopathie entwickelt sich aber bei Diabetikern schneller und stärker als bei Nicht-Diabetikern und stellt ein hohes Risiko für das Auftreten von Herzinfarkt, Schlaganfall und Gangrän der Extremitäten dar (HASSELBLATT und PANTEN 2001).

Die Diabetes-Therapie zielt darauf ab, akute Stoffwechselkomplikationen (diabetisches Koma) zu vermeiden, das Entstehen von Spätschäden hinauszuzögern und eingetretene Komplikationen zu therapieren (BERGER, 1990).

Der Typ-2-Diabetes ist die häufigste Diabetesform. In Deutschland sind 7-8 % aller Erwachsenen Diabetiker (einschließlich der nicht diagnostizierten Fälle; HAUNER, 1990; JANKA et al., 2000). 80-90 % der Typ 2 Diabetiker sind übergewichtig und zeigen deshalb eine verminderte Insulinwirksamkeit (sogenannte Insulinresistenz; BODEN, 1997). Eine Abnahme des Körpergewichts verbessert in vielen Fällen die diabetische Stoffwechsellage. Insulinresistenz führt aber nur dann zu einem Typ-2-Diabetes mellitus, wenn gleichzeitig ein Defekt der Insulinsekretion vorliegt, sodass die Insulinresistenz nicht durch gesteigerte Insulinsekretion kompensiert werden kann (CAHILL, 1988; FERRANNINI, 1998; GERICH, 1998).

Ist mit Umstellung der Ernährung, Reduktion von Übergewicht und Steigerung der körperlichen Aktivität innerhalb von 3 Monaten keine befriedigende Stoffwechseleinstellung möglich, wird zusätzlich mit oralen Antidiabetika therapiert (Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, HÄRING et al. 2002).

Mittel der Wahl für übergewichtige Typ 2-Diabetiker ist das Biguanid Metformin, sofern keine Kontraindikationen bestehen (HÄRING et al. 2002). Es hemmt vor allem die Glukoseproduktion der Leber (WOLLEN und BAILEY, 1988a und b).

Normalgewichtige Typ 2-Diabetiker werden meistens mit einem Sulfonylharnstoff oder dem Sulfonylharnstoff-Analogon Repaglinid behandelt (HÄRING et al. 2002).

Weiterhin stehen die PPAR $\gamma$ -Agonisten Pioglitazon und Rosiglitazon (Thiazolidindionderivate) und  $\alpha$ -Glukosidasehemmstoffe zur Verfügung. PPAR $\gamma$ -Agonisten verbessern primär die Insulinwirkung im Fettgewebe durch Aktivierung des PPAR $\gamma$



(peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) genannten Rezeptors, sie werden auch als Insulinsensitizer bezeichnet (SPIEGELMAN, 1998). Die  $\alpha$ -Glukosidasehemmstoffe Acarbose und Miglitol verzögern die Glukoseresorption aus dem Dünndarm, weil sie den intestinalen Stärke- und Saccharoseabbau beeinträchtigen (FÖLSCH et LEMBCKE, 1991).

## 1.2 Wirkmechanismus der Sulfonylharnstoffe und Analoga

Sulfonylharnstoffe und deren Analoga stimulieren die Insulinsekretion, weil sie in der Plasmamembran der pankreatischen B-Zelle (synonym  $\beta$ -Zelle) an die regulatorische Untereinheit (SUR1 = Sulfonylharnstoffrezeptor-Subtyp 1) der sogenannten ATP-empfindlichen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) binden, dadurch die Öffnungsaktivität dieser Kanäle hemmen und somit die B-Zelle depolarisieren (DEAN und MATTHEWS, 1968; MATTHEWS, 1985; STURGESS et al., 1985; TRUBE et al., 1986; HENQUIN, 1987; PANTEN et al., 1996). Die Depolarisierung öffnet spannungsabhängige Kalziumkanäle (vor allem L-Typ-Kanäle, aber auch R-Typ-Kanäle), sodass  $Ca^{2+}$ -Ionen vermehrt in das Zytosol der B-Zelle strömen und zum Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration führen (MATTHEWS, 1985; HENQUIN, 1987). Die gesteigerte  $Ca^{2+}$ -Ionenkonzentration setzt die Exozytose in Gang (HEDESKOV, 1980; HENQUIN, 1987).

Pankreatische  $K_{ATP}$ -Kanäle setzen sich aus jeweils vier  $K_{IR6.2}$ -Untereinheiten, die die  $K^+$ -Ionen leitende Pore bilden, und vier regulatorischen SUR1-Untereinheiten zusammen (CLEMENT et al., 1997; INAGAKI et al., 1997). Letztere beherbergen die hochaffinen Bindungsstellen für Sulfonylharnstoffe und deren Analoga (AGUILAR-BRYAN et al., 1995) und zwar an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran (SCHWANSTECHER et al., 1994).

$K_{ATP}$ -Kanäle gibt es auch in Neuronen, Herz- und Skelettmuskelzellen und in der glatten Gefäßmuskulatur (ASHCROFT et al., 1990; LAZDUNSKI 1996). Dabei gibt es neben dem SUR1 noch die Subtypen SUR2A und SUR2B, die in ihrer Aminosäuresequenz zu knapp 70% mit der von SUR1 übereinstimmen (ISOMOTO et al., 1996). Neuronale  $K_{ATP}$ -Kanäle sind wie die pankreatischen überwiegend aus SUR1 und  $K_{IR6.2}$  zusammengesetzt (INAGAKI et al., 1995). In  $K_{ATP}$ -Kanälen der Herz- und Skelettmuskulatur bzw. der glatten Gefäßmuskulatur sind wahrscheinlich SUR2A bzw. SUR2B die regulatorischen Untereinheiten (INAGAKI et al., 1996; BABENKO et al., 1998; ISOMOTO et al., 1996; YAMADA et al., 1997).

Als Sulfonylharnstoff-Analoga werden Substanzen bezeichnet, die zwar chemisch keine Sulfonylharnstoff-Derivate sind, aber durch denselben Mechanismus wie die

therapeutisch verwandten Sulfonylharnstoffe wirken. Zu den Sulfonylharnstoff-Analoga zählen die Benzoessäurederivate Meglitinid und Repaglinid, sowie das D-Phenylalaninderivat Nateglinid (LANDGRAF, 2000).

### **1.3 Mechanismus der $\beta$ -zytotropen Wirkung von Glukose und anderen Nährstoffen**

Bei einem Anstieg der Blutglukosekonzentration steigt gleichzeitig die Glukosekonzentration im Zytosol der B-Zelle entsprechend an, weil die Plasmamembran der B-Zelle über eine sehr hohe Aktivität des Glukosetransporters GLUT2 verfügt (BERG et al., 2002; THORENS et al., 1988). Daher setzt das Eingangsenzym der pankreatischen B-Zell-Glykolyse, die Glukokinase, den Anstieg der Blutglukosekonzentration in eine entsprechende Zunahme von Glykolyseprodukten um, die in den Mitochondrien die vermehrte Umwandlung von ADP in ATP bewirken (ASHCROFT et al., 1973). Daraus resultiert im Zytosol ein Anstieg von ATP und ein Abfall von ADP. Beide Änderungen hemmen die  $K_{ATP}$ -Kanäle (ASHCROFT et al., 1984; COOK und HALES, 1984; RORSMAN und TRUBE, 1985; DUNNE und PETERSEN, 1986).  $K_{ATP}$ -Kanäle besitzen nämlich neben den Sulfonylharnstoffbindungsstellen gesonderte Bindungsstellen für das  $K_{ATP}$ -Kanal-hemmende ATP und das  $K_{ATP}$ -Kanal-öffnende ADP. Glukose kann also durch Aktivierung des B-Zell-Stoffwechsels ebenso wie Sulfonylharnstoffe die Exozytose von Insulin triggern (PANTEN et al., 1986; HENQUIN, 2000; SCHUIT et al., 2001). Anders als Sulfonylharnstoffe kann Glukose aber darüber hinaus die durch den Anstieg des zytosolischen  $Ca^{2+}$  ausgelöste Exozytose noch massiv verstärken, weil die Aktivierung des mitochondrialen Metabolismus Verstärkersignale liefert, die bisher jedoch noch nicht identifiziert sind (GEMBAL et al., 1992; SATO et al., 1992; HENQUIN, 2000; HASTEDT, 2002).

Ähnlich wie Glukose sind auch einige andere Nährstoffe in der Lage, für sich alleine die Insulinsekretion zu stimulieren (PANTEN et al., 1972; PANTEN, 1975; PANTEN et al., 1984). Ein solcher Nährstoff ist z.B.  $\alpha$ -Ketoisocapronsäure (KIC), das Desaminierungsprodukt der Aminosäure L-Leucin. In den pankreatischen B-Zellen liefert KIC metabolische Energie (PANTEN et al., 1984; PANTEN, 1987): in den Mitochondrien entstehen einerseits beim oxidativen Abbau von KIC Acetoacetat (wird teilweise zu Acetyl-CoA umgewandelt), Acetyl-CoA und Reduktionsäquivalente (in Form von NADH und  $FADH_2$ ). Andererseits wird KIC mit Glutamin und Glutamat

transaminiert, wobei  $\alpha$ -Ketoglutarat gebildet wird (LENZEN et al., 1985).  $\alpha$ -Ketoglutarat stimuliert zusammen mit dem vermehrten Angebot an Acetyl-CoA den Zitratzyklus und bewirkt dadurch eine besonders starke Produktion von reduzierenden Äquivalenten. Das vermehrte Angebot an reduzierenden Äquivalenten aktiviert die Atmungskette und somit die Umwandlung von ADP zu ATP (BERG et al., 2002). Damit ist KIC genauso wie Glukose in der Lage, durch Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffnungsaktivität die Insulinsekretion in Gang zu setzen.

Ebenso wie es bei der Glukose-induzierten Insulinsekretion der Fall ist, liefert der durch KIC aktivierte mitochondriale Stoffwechsel Verstärkersignale. Dies lässt sich zeigen, wenn durch Sulfonylharnstoffe in maximal wirksamen Konzentrationen alle  $K_{ATP}$ -Kanäle der B-Zellen blockiert sind (PANTEN et al., 1988; HASTEDT, 2002). In dieser Situation kann KIC (und auch Glukose) die Insulinsekretion noch massiv steigern (sogenannter  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängiger Effekt).

#### **1.4 Nachteile der Sulfonylharnstoffe und Analoga**

Als Stimulatoren der Insulinsekretion haben Sulfonylharnstoffe und Analoga gegenüber Nährstoffen wie Glukose und KIC drei prinzipielle Nachteile:

1. Durch ihre direkte Wirkung am  $K_{ATP}$ -Kanal können Sulfonylharnstoffe und Analoga auch dann Insulinsekretion auslösen, wenn die Blutglukosekonzentration normal oder sogar erniedrigt ist. Daher können diese Medikamente schwere Hypoglykämien auslösen (ASPLUND et al., 1983; FERNER und NEIL, 1988; VAN STAA et al., 1997).

2. Sulfonylharnstoffe und Analoga produzieren keine Verstärkersignale. Daher lösen diese Substanzen nur eine schwache Insulinsekretion aus, wenn sie in vitro als einzige Stimulatoren auf B-Zellen einwirken (EFENDIC et al., 1979; GREGORIO et al., 1992). Das Auslösen einer unphysiologischen Insulinsekretion ohne Verstärkersignale ist vielleicht der Grund dafür, dass eine Sulfonylharnstofftherapie häufig im Laufe von einigen Jahren unwirksam wird (UKPDS 26: MATTHEWS et al., 1998).

3. Sulfonylharnstoffe haben keine direkte stimulierende Wirkung auf die Insulinbiosynthese der B-Zellen (SCHATZ et al., 1972). Dagegen werden durch den Stoffwechsel von Glukose oder anderen Nährstoffen (z.B. KIC) in der B-Zelle Signale produziert, die die Transkription des Insulins und die Insulinbiosynthese aktivieren (PARRY und TAYLOR, 1966; HOWELL und TAYLOR, 1966; MORRIS und KORNER, 1970 a und 1970 b). Dieser Mangel der Sulfonylharnstoffe könnte ein weiterer Grund für das relativ frühe Versagen der Sulfonylharnstofftherapie sein.

## 1.5 Bedarf an neuen Stimulatoren der Insulinsekretion

Die erheblichen Nachteile und Risiken einer Sulfonylharnstoff-Therapie sind der Anlass, nach besseren  $\beta$ -zytotropen Substanzen zu suchen. Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung von Medikamenten, die die GLP-1 (Glucagon-like peptide-1)-Wirkung an B-Zellen verstärken.

Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) zählt zu den Inkretinen, gastrointestinalen Hormonen, die nach Nahrungsaufnahme freigesetzt werden und die Insulinsekretion verstärken (CREUTZFELD, 1979). Es wird vor allem in den L-Zellen des Dünndarms aus Präproglukagon gebildet und in bioaktiver Form (GLP-1[7-36]amid, im Folgenden nur noch als GLP-1 bezeichnet) freigesetzt (EISSELE et al., 1992; BELL et al., 1983; FEHMANN et al., 1995). Die GLP-1-Wirkung wird über einen membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und das Adenylatcyclase/cAMP-System vermittelt (WIDMANN et al., 1994). Die Wirkdauer wird durch die kurze Halbwertszeit begrenzt, da GLP-1 über das Enzym Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) inaktiviert wird (DEACON et al., 1995). Seine blutzuckersenkende Wirkung kommt durch unterschiedliche Mechanismen zustande: Neben einer vermehrten Insulinfreisetzung wird außerdem die Glukagonfreisetzung und damit die hepatische Glukoseproduktion vermindert (KREYMANN et al., 1987; ORSKOV et al., 1988; NAUCK et al., 1996). Da GLP-1 zusätzlich die Magenentleerung und die Magensäureproduktion bremst, werden die Glukoseresorption aus dem Darm und somit die postprandialen Blutzuckerspitzen gemindert (KREYMANN et al., 1987, NAUCK et al., 1997, WETTERGREN et al., 1993). Für die Therapie des Typ 2 Diabetes ist ein weiterer Vorteil, dass GLP-1 Appetit und Nahrungsaufnahme hemmt (TURTON et al., 1996; FLINT et al., 1998). Die Stimulation der Insulinsekretion durch GLP-1 belegen klinische Studien an Typ 2-Diabetikern (NAUCK et al., 1996; VILSBOLL et al., 2002). Entscheidende Vorteile waren dabei das Ausbleiben von Hypoglykämien, da GLP-1 die Insulinsekretion in Abhängigkeit der Blutglukosekonzentration erhöht und bei normaler oder erniedrigter Blutglukosekonzentration unwirksam ist. Außerdem ist GLP-1 auch bei Patienten wirksam, bei denen die Sulfonylharnstofftherapie bereits versagt hat (KREYMANN et al., 1987; NAUCK et al., 1993; NAUCK et al., 1998). GLP-1 erfüllt damit viele wichtige Forderungen, die an ein neues, besseres  $\beta$ -zytotropes Antidiabetikum zu stellen sind. Ein großer Nachteil von GLP-1 als Antidiabetikum ist seine kurze Wirkdauer. Um dieses Problem zu umgehen, wird der Einsatz von GLP-1-Analoga, die langsamer metabolisiert werden, sowie von Hemmstoffen der DPP IV erforscht (AGERSO et al.,

2002; HOLST, 2003). Nachteilig ist auch, dass GLP-1 als Peptidhormon nicht peroral appliziert werden kann.

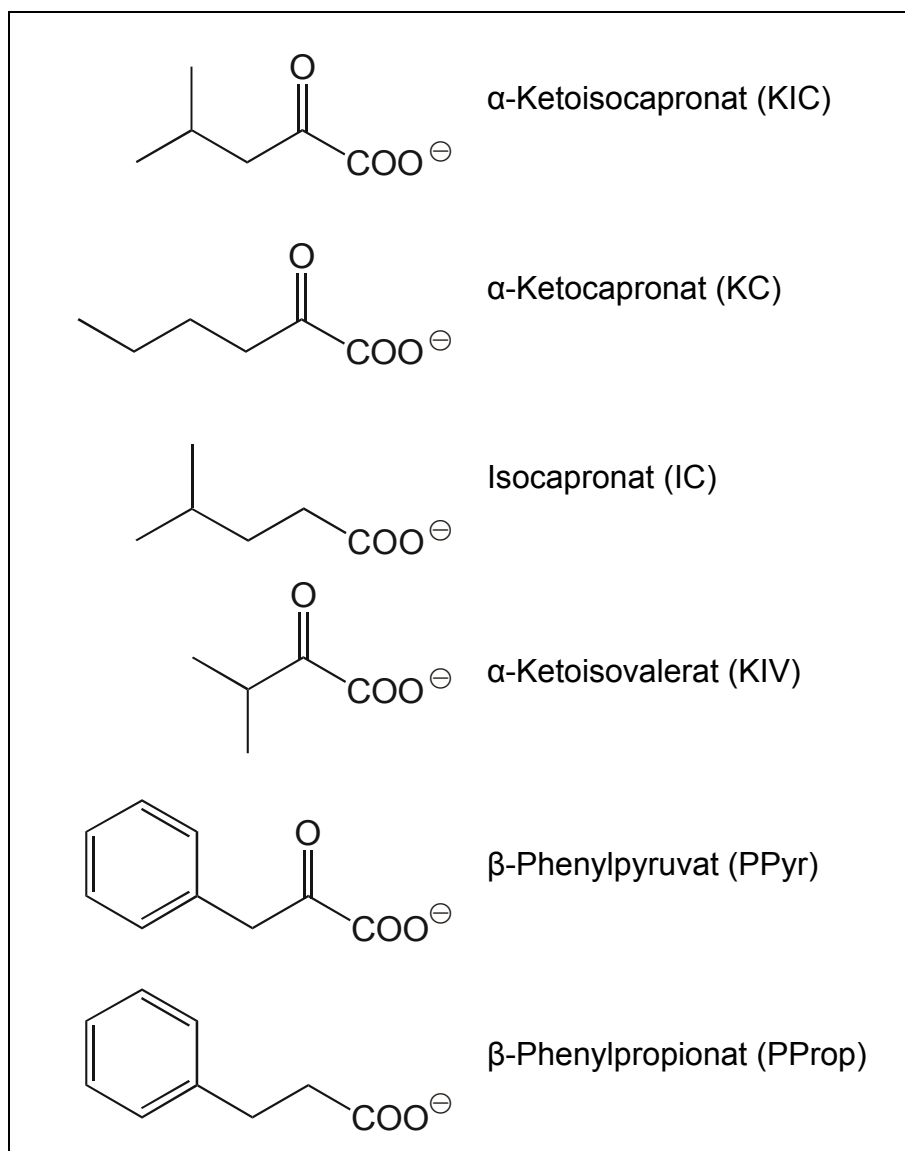
Ein zweiter Weg zu besseren  $\beta$ -zytotropen Antidiabetika ist herauszufinden, wie der Verstärkereffekt von Glukose und anderen Nährstoffen zustande kommt und aus dieser Erkenntnis  $\beta$ -zytrotrope Medikamente mit neuartigem Wirkmechanismus zu entwickeln. Hier kann KIC als Modells substanz dienen, weil KIC einen viel stärkeren Verstärkereffekt hat als Glukose (HASTEDT, 2002). Dieser Weg zu neuen Antidiabetika erfordert aber zunächst ein möglichst genaues Verständnis der KIC-Wirkungen auf die pankreatische B-Zelle.

## **1.6 Hemmung des $K_{ATP}$ -Kanals durch KIC**

In Patch Clamp-Experimenten im Cell-attached Modus (Kap. 3.3.5, Abb. 3.1; Messung an intakten B-Zellen) hemmt KIC die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität. Dies wurde auf gesteigerte mitochondriale ATP-Bildung durch den KIC-Metabolismus zurückgeführt (ASHCROFT et al., 1987, RIBALET et al., 1988). Allerdings wurde 1998 von BRÄNSTRÖM et al. berichtet, dass KIC den  $K_{ATP}$ -Kanal der B-Zelle direkt hemmen kann. Diese KIC-induzierte Hemmung wurde beobachtet, wenn KIC an der zytoplasmatischen Seite des inside-out-Patch (Kap. 3.3.5; Abb. 3.1) der B-Zell-Plasmamembran appliziert wurde.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Der direkte  $K_{ATP}$ -Kanal-hemmende Effekt von KIC sollte genauer charakterisiert werden. Dazu sollten Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für KIC und verwandte Monokarbonsäuren erstellt werden. Die Strukturen der getesteten Substanzen sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Es wurden Informationen erwartet, welche Strukturelemente für den direkten  $K_{ATP}$ -Kanal-hemmenden Effekt der Substanzen relevant sind. Außerdem sollte eine Abschätzung ermöglicht werden, ob dieser direkte Effekt bei der Insulin-freisetzenden Wirkung von KIC eine Rolle spielt.



**Abb. 2.1** Strukturformeln der untersuchten Monokarboxylate

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Zellkultur und Transfektion von COS1-Zellen

Die COS1-Zellen wurden, wie im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Braunschweig etabliert ist, gezüchtet und transfiziert (siehe Dissertationen SIEVERDING, 1998; MEYER, 1999). Bei den Arbeiten der Zellkultur und der Transfektion der COS-Zellen unterstützten mich Frau Fürstenberg und Frau Rattunde. COS-Zellen (**CV**-1, **O**origin of **SV**40; GLUZMAN, 1981) sind Derivate einer permanenten Nierenzelllinie afrikanischer grüner Meerkatzen (**CV**-1) die mit SV40-Viren (**S**imian **V**irus) infiziert wurden.

Für die Methoden der Zellkultur, Transfektion und Membranpräparation gilt: wenn im Folgenden von „Wasser“ die Rede ist, so ist aqua bidestillata gemeint. Für die Herstellung der Lösungen und Puffer wurden Salze und Chemikalien der Qualität „pro analysi“ eingesetzt und zur pH-Einstellung wurde NaOH- und HCl-Lösungen verwendet soweit nichts anderes angegeben wird. Es wurde steril gearbeitet. Zur Herstellung wurden sterile Ausgangssubstanzen verwendet, soweit die Lösungen und Medien nicht abschließend sterilisiert werden konnten. Die Arbeiten wurden an Sicherheitswerkbänken der Klasse 2 (Hera Safe HS12, Fa. Heraeus) durchgeführt.

##### 3.1.1 Kultivierung, Passagierung und Kryokonservierung von COS-Zellen

Die COS-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM-Medium (Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium T043-10, Fa. Biochrom) mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum, Fa. Kraeber) kultiviert und alle 3 – 4 Tage passagiert. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit Hilfe der Einfrierbox Mr. Frosty (Fa. Nunc) langsam auf -70 °C abgekühlt und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

##### 3.1.1.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

###### *A) Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (20.000 IE/ml bzw. 20.000 µg/ml)*

Penicillin G-Natrium (Fa. Biochrom) und Streptomycinsulfat (Fa. Biochrom) wurden in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung gelöst und bei -20 °C gelagert.

###### *B) Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) + 10 % FCS*

13,5 g DMEM–Trockenmedium, 2,2 g Natriumhydrogencarbonat, 5 ml der Penicillin/Streptomycin–Stammlösung (Endkonzentration 100 IE/ml bzw. 100 µg/ml) in Wasser ad 1000 ml gelöst, pH 7,15. Die Lösung wurde unter Verwendung eines Edelstahl–Druck–Filtrationsgeräts (SM 16268 107500,; Vorfilter 13400–130 K; Hauptfilter 0,2 µm; 11307–142, Fa. Sartorius) sterilfiltriert. Das Medium wurde bis zu 8 Wochen bei 4 °C gelagert und unmittelbar vor dem Gebrauch wurden 100 ml fötales Kälberserum (FCS; sterilfiltriert, Fa. Kraeber; 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert) zugegeben.

### **3.1.2 Transformation und Plasmidpräparation**

COS-Zellen wurden für die Patch-Clamp-Experimente mit Plasmid-DNA transient transfiziert, die für SUR1 und K<sub>IR</sub>6.2 codierte. Die Plasmid-DNA wurde durch Transformation in Epicurian coli XL1-Blue-Bakterien mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG-Methode) vermehrt.

#### *3.1.2.1 Lösungen für die Transformation und Plasmidpräparation*

##### *A) Glukoselösung (1 M, steril)*

Wässrige Lösung von Glukose–Monohydrat („für die Mikrobiologie“, Fa. Merck), unter Verwendung des Spritzenvorsatzes Filtropur S 0,2 (Porengröße 0,2 µm, Fa. Sarstedt) sterilfiltriert.

##### *B) Kaliumchlorid–Stammlösung (0,25 M, steril, pH 7,0)*

##### *C) Luria–Bertani–Medium (LB–Medium)*

Lösung von 10 g Select Pepton 140 (Fa. Gibco), 5 g Hefeextrakt (30393–029, Fa. Gibco) und 10 g NaCl in 1000 ml Wasser, pH 7,0, autoklaviert.

##### *D) SOB–Medium*

Lösung von 20 g Select Pepton 140, 5 g Hefeextrakt (30393–029, Fa. Gibco), 0,5 g NaCl und 10 ml 0,25 M Kaliumchlorid–Lösung (3.1.2.1 B) in 1000 ml Wasser, pH 7,0, autoklaviert.

##### *E) SOC–Medium*

100ml SOB–Medium (3.1.2.1 D) wurden, nach abkühlen auf ca. 60 °C, 2 ml 1 M Glukoselösung (3.1.2.1 A) zugesetzt.



*F) Ampicillin–Stammlösung (50 mg/ml)*

Wässrige Lösung von Ampicillin (Fa. Boehringer Mannheim), sterilfiltriert (vgl. 3.1.2.1 A), Lagerung bei –20 °C vor Licht geschützt.

*G) LB–Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin*

15 g Agar–Agar (Fa. Roth) wurden zu 1 l LB–Medium (3.1.2.1 C) gegeben und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurden 2 ml der Ampicillin–Stammlösung (3.1.2.1 F) zugesetzt und Platten gegossen (ca. 30 ml pro 94 mm Petrischale). Lagerung bei 4 °C.

*H) Medium A zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien*

Lösung von 0,493 g Magnesiumsulfat und 0,4 g Glukose–Monohydrat in 200 ml LB–Medium (3.1.2.1 C), sterilfiltriert (3.1.2.1 A).

*I) Medium B zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien*

Lösung von 36 ml Glycerin (wasserfrei, reinst, Fa. Merck), 12 g Polyethylenglycol 8.000 (Fa. Sigma) und 0,296 g Magnesiumsulfat in 100 ml LB–Medium (3.1.2.1 C), sterilfiltriert (3.1.2.1 A).

*J) Resuspensionspuffer für die Plasmidpräparation*

Lösung von 6,066 g Tris (Fa. Paesel + Lorei) und 3,722 g Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA; Fa. Merck) in 1000 ml Wasser, auf pH 8,0 eingestellt. In 100 ml dieser Lösung wurden 10 mg RNase A (19101, Fa. Qiagen) gelöst. Lagerung bis 6 Monate bei 4 °C.

*K) Lysispuffer für die Plasmidpräparation*

8 g NaOH und 10 g Natriumdodecylsulfat (Spezialqualität, Fa. Boehringer Mannheim) wurden in Wasser zu 1000 ml gelöst.

*L) Neutralisationspuffer für die Plasmidpräparation*

294,42 g Kaliumacetat („für die Molekularbiologie“, Fa. Merck) wurden in 500 ml Wasser gelöst, mit Eisessig auf pH 5,5 eingestellt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

*M) Equilibrierpuffer für die Plasmidpräparation*

43,83 g Natriumchlorid und 10,46 g 4–Morpholinpropansulfonsäure (MOPS; Fa.

Roth) wurden in 700 ml sterilem Wasser gelöst und auf pH 7,0 eingestellt. Nach Zugabe von 156,25 ml technischem Ethanol und 1,5 ml Triton X-100 (Fa. Boehringer Mannheim) wurde mit Wasser ad 1000 ml aufgefüllt.

*N) Waschpuffer für die Plasmidpräparation*

58,44 g Natriumchlorid und 20,92 g MOPS wurden in 1500 ml Wasser gelöst auf pH 7,0 eingestellt. Nach Zugabe von 312,5 ml technischem Ethanol wurde mit Wasser ad 2000 ml aufgefüllt.

*O) Elutionspuffer für die Plasmidpräparation*

73,05 g Natriumchlorid und 6,066 g Tris (Fa. Paesel + Lorei) wurden in 800 ml Wasser gelöst auf pH 8,5 eingestellt. Nach Zugabe von 156,25 ml technischem Ethanol wurde mit Wasser ad 1000 ml aufgefüllt.

*P) Tris/EDTA-Puffer*

Lösung von 1,21 g Tris und 372,2 mg EDTA in 1000 ml Wasser, pH 8,0, wurde in Portionen zu 100 ml autoklaviert.

*3.1.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien mittels PEG-Methode*

5 ml LB-Medium (3.1.2.1 C) wurden mit E. coli-Zellen (Epicurian Coli XL1-Blue) beimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator (Innova 4300, Fa. New Brunswick Scientific) über Nacht kultiviert. 500 µl dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Morgen auf 50 ml Medium A (3.1.2.1 H) gegeben und bis zu einer optischen Dichte von  $\lambda = 578 \text{ nm}$  0,55 (Spektralphotometer Uvikon 932, Fa. Kontron Instruments) bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde in Zentrifugenröhrchen 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Jouan Kühlzentrifuge GR 2022 mit Rotor AG 290.9, 1500 g, 2900 Upm). Nach Resuspension des Pellets in 500 µl kaltem Medium A (3.1.2.1 H) wurde 2,5 ml Medium B (3.1.2.1 I) zugemischt und 100 µl-Portionen bis zu einem Jahr bei -80 °C gelagert.

*3.1.2.3 Durchführung der Transformation und Bakterienvermehrung*

In ein steriles Reaktionsgefäß wurden 100 µl kompetente Zellen (3.1.2.2) sowie 2 µl der Plasmid-DNA-Lösung (50 µl/ml) pipettiert und vorsichtig geschwenkt. Der Ansatz wurde 30 Minuten ins Eisbad gestellt, dann im Wasserbad exakt 90 s bei 42 °C inkubiert und anschließend sofort 1 bis 2 Minuten im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe

von 900 µl SOC-Medium (3.1.2.1 E) wurde der Ansatz eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C gehalten, auf eine LB-Agarplatte (3.1.2.1 G) ausgestrichen, einige Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und schließlich über Nacht bei 37 °C inkubiert (Begasungsbrutschrank BB 6220, Fa. Heraeus Instr.). Am nächsten Tag wurde eine der über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien in 10 ml LB-Medium (3.1.2.1 C) überführt, dem zuvor 20 µl Ampicillin-Stammlösung (3.1.2.1 F) zugesetzt worden waren. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C kultiviert.

#### *3.1.2.4 Plasmidpräparation*

Am nächsten Tag wurden die Suspension aus 3.1.2.3 zentrifugiert (Jouan Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor AG 100.18, 6000 g, 4 °C, 15 min), das Pellet in 4 ml Resuspensionspuffer (3.1.2.1 J) resuspendiert, 4 ml Lysispuffer (3.1.2.1 K) zugegeben und vorsichtig durchmischt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 4 ml Neutralisationspuffer (3.1.2.1 L) zugesetzt, vorsichtig vermischt, 15 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (Jouan Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor AG 16.20, 30.000 g, 4 °C, 30 min). Der Überstand wurde abgenommen, auf eine mit 4 ml Equilibrierpuffer (3.1.2.1 M) bestückte Säule (Qiagen-tip 20, 10023, Fa. Qiagen) gegeben und zweimal mit 10 ml Waschpuffer (3.1.2.1 N) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 5 ml Elutionspuffer (3.1.2.1 O) in ein steriles Gefäß eluiert, mit 3,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert (Jouan Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor AG 16.20, 25.000 g, 4 °C, 30 min), zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und zu einer Endkonzentration von 1 µg/µl in Tris/EDTA-Puffer (3.1.2.1 P) gelöst.

#### **3.1.3 Transfektion und histologische Lac Z-Färbung**

Die transiente Transfektion der COS-Zellen erfolgte mit einer modifizierten DEAE-Dextran-Methode. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz diente die histologische Lac Z-Färbung. Bei jeder Transfektion wurde eine Schale der COS-Zellen mit β-Galactosidase-Plasmid transfiziert. Die β-Galactosidase setzt farbloses X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid) in eine blaue Verbindung um, sodass der Anteil erfolgreich transfizierter Zellen durch Auszählung ermittelt werden konnte.

### 3.1.3.1 Lösungen

#### *A) Diethylaminoethyl–Dextran–Stammlösung (50 mg/ml), autoklaviert*

Diethylaminoethyl–Dextran, Fa. Sigma

#### *B) TBS–Puffer (Tris Buffered Saline)*

Lösung A: 80 g Natriumchlorid, 3,8 g Kaliumchlorid, 2,0 g wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat und 30 g Tris in 1000 ml Wasser, auf pH 7,5 eingestellt.

Lösung B: 1,5 g Kalziumchlorid und 1,0 g Magnesiumchlorid in 100 ml Wasser.

Beide Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Der TBS–Puffer wurde durch Mischen von 100 ml Lösung A mit 890 ml Wasser und anschließendem Eintropfen von 10 ml Lösung B hergestellt, sterilfiltriert (3.1.1.1 B) und bei 4 °C aufbewahrt.

#### *C) HBS–Puffer (Hepes Buffered Saline Solution)*

Lösung von 8 g Natriumchlorid, 0,37 g Kaliumchlorid, 107,7 mg wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat und 5 g HEPES („für die Gewebezucht“, Fa. Boehringer Mannheim) in 1000 ml Wasser, pH auf 7,05 eingestellt, sterilfiltriert (vgl. 3.1.1.1 B), Lagerung bei 4°C.

#### *D) 10 % FCS in TBS*

3,6 ml TBS (3.1.3.1 B) wurden mit 0,4 ml sterilfiltriertem fötalem Kälberserum (FCS) gemischt, jeweils frisch hergestellt.

#### *E) 10 % DMSO in HBS*

4,5 ml HBS (3.1.3.1 C) wurden mit 0,5 ml autoklaviertem DMSO gemischt, jeweils frisch hergestellt.

#### *F) Trispuffer pH 7,4 (1 M), autoklaviert*

36,3 g Tris wurden in 200 ml Wasser gelöst, mit HCl 37 % auf pH 7,4 eingestellt, mit Wasser ad 300 ml aufgefüllt.

#### *G) Natriumchlorid–Lösung (5 M), autoklaviert*

#### *H) Chloroquin–Stammlösung*

51,6 mg Chloroquin (Fa. Sigma) wurden in 9,22 ml Wasser gelöst und mit 0,5 ml 1 M Trispuffer (3.1.3.1 F) pH 7,4 und 0,28 ml 5 M Natriumchlorid-Lösung (3.1.3.1. G) vermischt. Nach Sterilfiltration (wie in 3.1.1.1 B) wurde die Lösung vor Licht geschützt bei –20 °C gelagert.

*I) DMEM ohne FCS*

Die unter 3.1.1.1 B beschriebene Lösung wurde ohne FCS-Zusatz verwendet.

*J) DMEM/100 µM Chloroquin/ 2 % FCS-Medium*

200 µl FCS, 100 µl Chloroquin-Stammlösung (3.1.3.1 H) und 9,7 ml DMEM-Medium ohne FCS (3.1.3.1 I) wurden gemischt. Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt (Lichtschutz!).

*3.1.3.2 Transfektion mittels DEAE-Dextran-Methode*

24 Stunden vor der Transfektion wurden für Patch Clamp-Experimente 200.000 COS-Zellen in 94 mm Petrischalen in Kulturmedium (3.1.1.1 B) ausgesät.

20 µg SUR1-Plasmid und 20 µg K<sub>IR</sub>6.2-Plasmid wurden mit TBS (3.1.3.1 B) ad 60 µl gemischt. Nach Zusatz von 83,6 µl DEAE-Dextran (3.1.3.1 A) und 36,4 µl TBS (3.1.3.1 B) wurde gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit konnten die Zellen zweimal mit HBS (3.1.3.1 C) gewaschen und Lösung 3.1.3.1 D hergestellt werden, mit der anschließend das DNA-DEAE-Dextran-Gemisch verdünnt und auf die Zellen pipettiert wurde.

Dieser Ansatz wurde dann 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert (Begasungsbrutschrank BB6220, Fa. Heraeus Instruments). Der Überstand wurde von den Zellen abgesaugt, dann 5 ml DMSO-Lösung (3.1.3.1 E) für genau 2 Minuten zugegeben und anschließend durch das Chloroquinmedium (3.1.3.1 J) ersetzt und der Ansatz wurde für weitere 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit HBS (3.1.3.1 C) wurden die Zellen mit 12 ml Kulturmedium (3.1.1.1 B) im Brutschrank aufbewahrt.

Für die Patch Clamp-Experimente wurden die Zellen in 35 mm Schalen umgesetzt. Sie konnten 48-96 Stunden nach der Transfektion verwendet werden.

Die Lac Z-Färbung zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde 48 Stunden nach der Transfektion angesetzt.

### 3.1.3.3 Histologische Lac Z-Färbung

#### 3.1.3.3.1 Lösungen für die histologische Lac Z-Färbung

##### A) X-Gal (10 mg/ml)

500 mg X-Gal (Fa. Roth) 50 ml Dimethylformamid („zur Synthese“, Fa. Roth) lösen (Abzug!), Lagerung bei -20 °C unter Lichtschutz.

##### B) Magnesiumchlorid (2 M)

##### C) Kaliumferrocyanat (0,5 M)

Wässrige Lösung von Kaliumferrocyanat (Fa. Sigma), Lagerung unter Lichtschutz.

##### D) Kaliumferricyanat (0,5 M)

Wässrige Lösung von Kaliumferricyanat (Fa. Sigma), Lagerung unter Lichtschutz.

##### E) Phosphatpuffer (CMF-PBS)

Die Lösung von 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g wasserfreiem Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l Wasser, pH auf 7,3 eingestellt, in Aliquoten autoklaviert.

##### F) 0,2 % Triton X-100 in CMF-PBS

200 µl Triton X-100 (Fa. Boehringer Mannheim) ad 100 ml in CMF-PBS (3.1.3.3.1 E) gelöst.

##### G) 3 % Paraformaldehyd in CMF-PBS

30 g Paraformaldehyd (Fa. Merck), unter dem Abzug abgewogen, wurden in 800 ml 60 °C warmem CMF-PBS (3.1.3.3.1 E) gelöst, mit 10 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und ad 1000ml mit CMF-PBS aufgefüllt. Die Lösung wurde filtriert und in Aliquoten bei -20 °C eingefroren.

##### H) Färbelösung

Lösung von jeweils 100 µl Kaliumferrocyanat (3.1.3.3.1 C) und Kaliumferricyanat (3.1.3.3.1 D), 1 ml X-Gal (3.1.3.3.1 A) und 10 µl 2 M MgCl<sub>2</sub> (3.1.3.3.1 B) in Wasser ad 10 ml.

#### 3.1.3.3.2 Färbung

Die Zellen wurden zweimal mit CMF-PBS (3.1.3.3.1 E) gewaschen, für 10 Minuten

mit 5 ml 3 % Paraformaldehyd in CMF-PBS (3.1.3.3.1 F) bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Anschließend wurde 5 ml 0,2 % Triton X-100 in CMF-PBS (3.1.3.3.1 E) auf die Zellen gegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und viermal mit CMF-PBS (3.1.3.3.1 E) gewaschen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit der Färbelösung (3.1.3.3.1 G) bei 37 °C in der Dunkelheit inkubiert, zweimal gewaschen und das Resultat ausgewertet.

#### *3.1.3.3.3 Auswertung der Färbung*

Die Transfektionseffizienz wurde durch Auszählung der blau gefärbten Zellen unter dem Mikroskop ermittelt.

### **3.2 Isolierung von Maus-Pankreasinseln und Gewinnung von Einzelzellen**

Die Inselzellen wurden, wie im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig etabliert, gewonnen und gezüchtet. Die Technik ist eine Modifikation der von LACY (1967) und von LERNMARK (1974) beschriebenen Methoden.

Da die gewonnenen Zellen für die Patch-Clamp-Experimente bis zu 72 Stunden im Brutschrank aufbewahrt werden, werden Gefäße und Besteck sterilisiert und sterilfiltrierte Lösungen verwendet. Wenn im Folgenden von „Wasser“ die Rede ist, so ist aqua bidestillata gemeint. Für die Herstellung der Lösungen und Puffer wurden Salze und Chemikalien der Qualität „pro analysi“ eingesetzt. Weiterhin wird bei den Lösungen vor Gebrauch der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls mit sterilfiltrierter HCl-Lösung korrigiert.

#### **3.2.1 Basismedien für die Einzelzellisolierung**

*A) Lösung I: Basismedium für die Inselisolierung (115 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM HEPES; 20 mM NaHCO<sub>3</sub>; 5 mM Glukose; 0,1 %Albumin; pH 7,4)*

Lösung I wurde alle 3 Wochen durch Lösen der Substanzen in Wasser hergestellt und sterilfiltriert (Vorfilter: Glasfibre Filter 13400-130 K; Hauptfilter: Cellulose Nitrat Filter 11307-142 G Pore 0,2 µm, Satorius) in 100 ml-Schraubdeckelgefäße abgefüllt. Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt und vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Sterilkontrolle wurde eines der Gefäße eine Woche bei 37 °C inkubiert und auf Kontamination kontrolliert.

### *B) Collagenase*

Zur Anwendung kam Collagenase P der Fa. Roche. Da es sich um Probechargen ohne gleichbleibende Qualität handelte, musste ausprobiert werden, wie lange der Verdau für ein optimales Ergebnis dauern musste. Die Inseln sollten sich gut aus dem Gewebe lösen lassen, durften aber nicht glasig erscheinen. Die Zeiten schwankten zwischen 7'30'' und 11 Minuten, und mussten jeweils auf 5 Sekunden genau eingehalten werden.

### *C) Kalziumfreie Lösung (135 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 25 mM HEPES; 0,5 mM EGTA; 3 mM Glukose; 1% Albumin; pH 7,4; sterilfiltriert)*

Die durch Lösen der angegebenen Substanzen in Wasser hergestellte Kalziumfreie Lösung wurde sterilfiltriert und in 5ml Portionen bis zu 3 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

### *D) RPMI-Medium zur Aufbewahrung der isolierten Einzelzellen (RPMI 1640 mit 10 mM Glukose, Bikarbonat und 10% FCS)*

Für 1 l Medium wurden 2 g NaHCO<sub>3</sub> (entsprechend 24 mM Endkonzentration), 10 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (Endkonzentration 100 IU/ml bzw. 100 µg/ml Fa. Biochrom) und 10,42 g RPMI-Trockenmedium (T 121-10, Fa. Seromed) zunächst in 900 ml Wasser gelöst, auf pH 7,2 eingestellt, sterilfiltriert und in Portionen zu 45 ml bei 2° bis 8°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde das fehlende Volumen (10%) durch FCS ergänzt.

## **3.2.2 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten NMRI-Albinomäuse im Alter von 9 bis 13 Wochen der Firma Harlan Winkelmann, die in der Zentralen Einrichtung für Tierhaltung der TU Braunschweig gehalten und vermehrt wurden. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Trinkwasser und zu Altromin 1324-Futter, einem Standard-Diätfutter, die Raumtemperatur lag bei konstanten 25 °C.

## **3.2.3 Durchführung der Inselisolierung und Einzelzellgewinnung**

Die Inseln wurden durch Collagenase-Andauung des Pankreas isoliert (MOSKALEWSKI, 1965). Dabei wurden früher beschriebene Techniken (LACY und KOSTIANOVSKY, 1967; LERNMARK, 1974) modifiziert:



Eine Maus wurde durch Dekapitierung getötet, ihre Bauchhöhle wurde eröffnet und der Pankreas exzidiert, in ein Gefäß mit etwa 3 ml Lösung I (3.2.1 A) gegeben und gegebenenfalls von Haaren oder Fremdgewebe befreit. Anschließend wurde der Pankreas in 2 ml Lösung I überführt und mit einer Schere 3 Minuten in kleine Stücke (<1 mm) geschnitten. Das feingeschnittene Gewebe wurde in ein Schraubdeckelgefäß mit 1 mg Collagenase (3.2.1 B) pipettiert und gut verschlossen im Schüttelwasserbad (ST1-338, Fa. Bühler) bei 37 °C mit einer Frequenz von 328/min geschüttelt. Nach etwa 8 Minuten wurde der Ansatz noch 5-10 Sekunden lang per Hand geschüttelt und der Verdau durch Verdünnen mit etwa 20 ml Lösung I (3.2.1 A) unterbrochen. Nach fünfminütiger Sedimentation des Ansatzes wurde der Überstand bis auf 3 ml abgesaugt, das Gefäß erneut mit Lösung I aufgefüllt und das angedaute Gewebe in eine schwarze Petrischale überführt. Unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss) wurden die Inseln von anhaftendem Gewebe befreit, immer aus einer Schale heraus in die nächste pipettiert und dabei dreimal mit Lösung I gewaschen.

So wurden etwa 80 bis 130 Inseln gesammelt, für die Gewinnung von Einzelzellen in ein 10 ml-Röhrchen mit 5 ml Kalziumfreier Lösung (3.2.1 C) überführt und für 10 Minuten darin belassen. Das Röhrchen wurde für 1 Minute auf maximaler Stufe aufgeschüttelt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) und 1 Minute mit 1000 Upm bei 20 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Nach dem Absaugen des Überstandes wurde mit 5 ml RPMI-Medium (3.2.1 D) gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 200 µl RPMI-Medium resuspendiert und auf sechs 35 mm Petrischalen verteilt. Dazu wurden jeweils 33 µl der Suspension in die Mitte der Schälchen appliziert. Die Zellen wurden bei 37 °C (Begasungsbrutschrank BB6220, Fa. Heraeus Instruments) aufbewahrt. Nach 2 bis 3 Stunden wurde in jedes Schälchen 2,5 ml RPMI-Medium (3.2.1 D) zugegeben. Die Zellen setzten sich so einzeln am Boden der Petrischälchen ab und konnten im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach der Präparation in der Patch-Clamp-Technik untersucht werden.

### **3.3 Patch Clamp-Experimente**

Die Messungen wurden, wie im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig etabliert, durchgeführt (siehe Dissertation GROSS, 2000). Die Technik stellt eine Modifikation der Patch Clamp-Methode von NEHER und SAKMAN dar (HAMILL et al., 1981).

### 3.3.1 Lösungen für die Messung von Einwärtsströmen am inside-out Patch

#### 3.3.1.1 Basislösungen

A) *Pipettenlösung* (2,6 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES, 146 mM KCl, 1,2 mM  $\text{MgCl}_2$ )

Die Lösung, mit KOH auf pH 7,4 eingestellt, wurde bei 4 °C gelagert.

B) *Extrazelluläre Lösung* (EZ; NaCl 140mM, KCl 5,6mM,  $\text{MgCl}_2$  1,2mM,  $\text{CaCl}_2$  2,6mM, Hepes 10mM )

Die Lösung, mit NaOH auf pH 7,3 eingestellt, wurde bei 4°C gelagert.

C) *Intrazelluläre Lösung* (IZ; 140 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM EGTA, 5 mM HEPES)

Die Lösung, mit KOH auf pH 7,3 eingestellt, wurde 4 °C gelagert.

#### 3.3.1.2 Kontrolllösungen mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP)

A) 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ , in IZ

B) 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM NaCl in IZ

C) 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM NaCl in IZ

D) 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM NaCl in IZ

E) 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM NaCl in IZ

F) 0,8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM NaCl in IZ

Die Lösungen 3.3.1.1 A bis F wurden durch Lösen der Salze in IZ-Lösung (3.3.1.1 C) hergestellt und bei 4°C aufbewahrt.

#### G) 1 mM ATP-Lösungen

30,26 mg ATP ( $\text{Na}_2\text{ATP} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ , Mr 605,2; Fa. Boehringer) wurden in 50 ml des benötigten Lösungsmittels (3.3.1.2 A, B, C, D, E oder F) durch vortexen gelöst und der pH mit 2 M KOH auf 7,3 eingestellt. Die Lösung wurde täglich frisch hergestellt.

#### 3.3.1.3 Lösungsmittel für Adenosin-5'-diphosphat (ADP)

A) 0,4 mM  $\text{MgCl}_2$  in IZ

*B) 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NaCl in IZ*

*C) 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl in IZ*

*D) 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl in IZ*

*E) 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaCl in IZ*

*F) 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM NaCl in IZ*

Die Lösungen 3.3.1.3 A bis F wurden durch lösen der Salze in IZ-Lösung (3.3.1.1 C) hergestellt und bei 4°C aufbewahrt.

*G) 1 mM ADP-Lösungen*

50,13 mg ADP (K-ATP 2 H<sub>2</sub>O, Mr 501,3; Fa. Boehringer) wurden in 100 ml des benötigten Lösungsmittels (3.3.1.3 A bis F) durch vortexen gelöst und mit KOH auf pH 7,3 eingestellt. Die Lösung wurde täglich frisch hergestellt.

#### *3.3.1.4 Testlösungen*

*A-D) Natrium- $\alpha$ -ketoisocapronat (KIC, Fa. Sigma)*

*A) 5 mM KIC und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*B) 10 mM KIC und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*C) 20 mM KIC und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*D) 40 mM KIC und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*E-H) Natrium- $\alpha$ -ketocapronat (KC, Fa. Sigma)*

*E) 5 mM KC und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*F) 10 mM KC und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*G) 20 mM KC und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*H) 40 mM KC und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*I-K) Natrium- $\alpha$ -ketoisovalerat (KIV, Fa. Fluka)*

*I) 10 mM KIV und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*J) 20 mM KIV und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*K) 40 mM KIV und 1mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

Die Testlösungen wurden durch Lösen der Substanzen und Einstellen auf pH 7,3 täglich frisch hergestellt.

*L-O) Natrium- $\beta$ -phenylpyruvat (PPyr, Fa. Sigma)*

*L) 0,2 mM PPyr und 1 mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*M) 1 mM PPyr und 1 mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*N) 5 mM PPyr und 1 mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

*O) 20 mM PPyr und 1 mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A*

Natrium- $\beta$ -phenylpyruvat lässt sich schlecht vom Lösungsmittel benetzen. Um es vollständig zu lösen wurde die Substanz in ein Becherglas eingewogen, die ADP-Lösung hinzugefügt, der Ansatz 20 Minuten langsam gerührt und anschließend für 5 bis 10 Minuten im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 255H) gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt. Auch diese Lösungen wurden täglich frisch hergestellt.

*P) 210  $\mu$ M Meglitinid (Fa. Hoechst)*

Es wurde zunächst eine 21 mM Stammlösung in 50 mM NaOH hergestellt, die mit 1 mM ADP in Lösungsmittel 3.3.1.3 A verdünnt wurde

### **3.3.2 Lösungen für die Messung von Auswärtsströmen am inside-out Patch**

#### *3.3.2.1 Basislösungen*

*A) Pipettenlösung (140 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>)*

Die Lösung, mit KOH auf pH 7,4 eingestellt, wurde bei 4 °C gelagert.

*B) Extrazelluläre Lösung (EZ; wie 3.3.1.1 B)*

*C) Intrazelluläre Lösung (IZ; 125 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 5 mM HEPES)*

Die Lösung, mit KOH auf pH 7,3 eingestellt, wurde 4 °C gelagert.

### *3.3.2.2 Kontrolllösungen mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP)*

*A) 0,8 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM NaCl in IZ*

*B) 0,8 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM NaCl in IZ*

Die Lösungen der Substanzen in IZ (3.3.2.1 C) wurden bei 4 °C aufbewahrt.

*C) 1 mM ATP-Lösungen*

30,26 mg ATP wurde in 3.3.2.2 A) oder B) gelöst und der pH mit 2 M KOH auf 7,3 eingestellt. Die Lösung wurde jeden Tag frisch hergestellt.

### *3.3.2.3 Nukleotid-freie Kontrolllösung mit Natriumausgleich*

*A) 20 mM NaCl in IZ*

*B) 5 mM NaCl in IZ*

Die angegebene Menge NaCl wurde in IZ (3.3.2.1 C) gelöst, auf pH 7,3 eingestellt und bei 4°C gelagert.

### *3.3.2.4 Testlösungen*

*A) 20 mM KIC*

*B) 5 mM KIC*

*C) 20 mM KIV*

*D) 20 mM Natriumisocapronat (IC, synonym Methylvaleriansäure, Fa. Sigma)*

Die Säure, eine flüssige Verbindung, wurde zunächst mit 2 M NaOH in äquimolarem Verhältnis neutralisiert.

*E) 20 mM KC*

*F) 20 mM PPyr*

Um die Substanz vollständig in Lösung zu bringen wurde das Ultraschallbad eingesetzt.

*G) 20 mM Natrium-β-phenylpropionat (PProp, synonym Dihydrozimtsäure, Fa. Sigma)*

Die Säure wird zunächst mit 2 M NaOH neutralisiert.

*H) 2  $\mu$ M Glipizid (Fa. Pfizer,  $M_r$  446)*

Es wurde zunächst eine 400  $\mu$ M Stammlösung in 50 mM NaOH hergestellt, die schließlich zur Testlösung verdünnt wurde.

*I) 210  $\mu$ M Meglitinid (Fa. Hoechst)*

Es wurde zunächst eine 21 mM Stammlösung in 50 mM NaOH hergestellt, die schließlich zur Testlösung verdünnt wurde.

Als Lösungsmittel für 3.3.2.4 A bis I diente jeweils IZ (3.3.2.1 C). Die Testlösungen wurden jeweils frisch hergestellt und gegebenenfalls mit 2 M KOH auf pH 7,3 eingestellt.

### **3.3.3 Aufbau des Patch-Clamp-Messplatzes**

#### **3.3.3.1 Pipetten**

Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas (2 mm Außendurchmesser, 0,3 mm Wandstärke) mit Hilfe eines vertikalen Pipettenziehgerätes (Patch Pipette Puller PA-10, Fa. E.S.F. electronic) hergestellt und an der Spitze hitzepoliert, indem sie für 30 s vor einen mit Glas überzogenen und erhitzten Platin-Iridium-Draht gehalten wurden. Der Durchmesser an der Pipettenspitze liegt so bei etwa 1  $\mu$ m. Die Pipetten wurden mit Hilfe einer 2 ml Spritze mit 2  $\mu$ m Filteraufsatz und Kanüle von hinten mit den entsprechenden Pipettenlösungen (3.3.1.1 A oder 3.3.2.1 A) befüllt. Nach Einspannen der Pipette in die Haltevorrichtung taucht die Pipettenelektrode, ein chlorierter Silberdraht, in die Pipettenlösung hinein. Die Widerstände der Pipetten lagen nach der Füllung bei 5-7 M $\Omega$ .

#### **3.3.3.2 Zellen**

Die B-Zellen wurden in 35 mm Petrischalen aufbewahrt; die COS-Zellen wurden vor Verwendung in 35 mm Petrischalen umgesetzt, in denen sie sich innerhalb von 2 Stunden am Boden absetzten. Die Zellen wurden bis zum Beginn der Versuche mit extrazellulärer Lösung EZ (3.3.1.1 B) umspült. Die Petrischalen dienten zugleich als Badkammer, die Lösungen wurden durch Austausch der Badlösung appliziert, ein Badwechsel dauerte ungefähr 30 s.

### *3.3.3.3 Elektroden und Agarbrücke*

Als Bad- und als Pipettenelektroden wurden chlorierte Silberdrähte verwendet. Die Badelektrode wurde über eine Agarbrücke, die mit 3,6 % Agar in 3 M KCl-Lösung gefüllt war, mit der Badlösung verbunden. Die Agarbrücke wurde in 150 mM KCl-Lösung bis zu 8 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt.

### *3.3.3.4 Aufbau*

Die 35 mm Schalen mit den Zellen und einem Plexiglaseinsatz mit Aussparungen für Zu- und Ablauf wurden in den Mikroskoptisch des inversen Mikroskops (IM 35; Zeiss) eingesetzt. Um die Patchpipette unter Mikroskopkontrolle präzise auf die Zellmembran aufbringen zu können, wurde ein Mikromanipulator (MMW-203, Narishige, Tokio) verwendet. An der Einspannungsvorrichtung der Patchpipette ist ein Schlauch angebracht, über den an die Pipette mit Hilfe einer kleinen Spritze ein Druck angelegt werden kann. Zur Vermeidung von Erschütterungen wurden Mikroskop und Mikromanipulator auf einem schwingungsgedämpften Tisch (LT 100/80, Barry Controls) aufgebaut.

### *3.3.3.5 Datenverarbeitung und Auswertung*

Die Registrierungen wurden unter Verwendung eines L/M-EPC7 Patch-Clamp-Verstärkers (Fa. List Electronic) durchgeführt. Die Stromsignale wurden bei 2 kHz mit einem 4-Pol Besselfilter (LPBF-48DG, npí) Tiefpass gefiltert, mit einem A/D-Wandler digitalisiert (VR-10B, Fa. Instrutech, USA), auf einem Videoband (Panasonic NV-SD 230 Videorecorder) gespeichert und mit Hilfe eines Thermoschreibers (Graphtec thermal arraycorder WR 7400) zu Papier gebracht. Die Daten wurden mit 10 kHz unter Einsatz eines Axolab 1200 Adapters (Fa. Axon Instruments, USA) digitalisiert und mit einem Analyseprogramm (pCLAMP 6.0, Fa. Axon Instruments) ausgewertet.

In Experimenten, in denen mehr als 5 Kanäle gleichzeitig geöffnet waren, wurde unter Verwendung des Analysenprogramms Clampfit (pClamp 6.0; Axon Instruments) der mittlere  $K_{ATP}$ -Strom gemessen und als Kanalaktivität definiert.

Experimente mit bis zu 4 gleichzeitig geöffneten Kanälen wurden mit der Halbamplituden-Schwellenwerttechnik (COLQUHOUN und SIGWORTH, 1995) unter Einsatz der Analysenprogramme FetchAn und pstat (pClamp 6.0) ausgewertet. Die Kanalaktivität wurde hier als Produkt aus der Zahl der im Beobachtungszeitraum

aktiven Kanäle (N) und der Offenwahrscheinlichkeit (P) definiert. Dazu wurde die Gesamtoffenzeit aller Kanäle durch die Beobachtungszeit dividiert.

### 3.3.4 Durchführung der Patch-Clamp Experimente

#### 3.3.4.1 Sealbildung und Patch Clamp-Konfigurationen

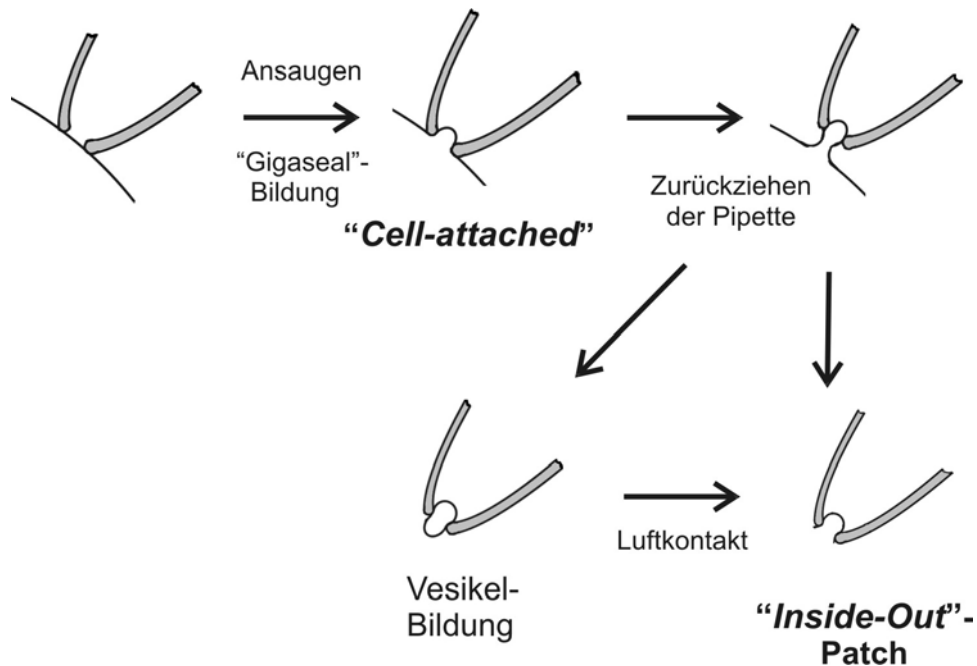
Eine vorbereitete Pipette (3.3.3.1) wird in die Badlösung abgesenkt, dabei wird ihr ein leichter Überdruck angelegt. Zunächst erfolgt der Nullabgleich des Verstärker- ausgangsstroms und der Pipettenwiderstand wird abgelesen. Die Pipettenspitze wird nun vorsichtig der Zelloberfläche angenähert, bis der Widerstand um etwa 5 mΩ steigt, dann wird ein leichter Unterdruck an die Pipette gelegt und das Pipettenpotential auf -20 mV gestellt. Im Idealfall entwickelt sich nun innerhalb weniger Minuten ein sogenanntes Gigaseal, ein Abdichtwiderstand von mehr als einem Gigaohm. Diese Anordnung nennt sich cell-attached-Modus (s. Abb.3.1). Wenn das Gigaseal mindestens eine Minute stabil geblieben ist, wird die Pipette schnell von der am Boden der Kulturschale haftenden Zelle weg bewegt. Der so von der Zelle abgelöste Membranfleck (Patch) befindet sich in der inside-out-Konfiguration, denn die Innenseite der Zellmembran zeigt von der Pipette aus betrachtet nach außen. Nach Einstellen der gewünschten Pipettenspannung sollten nun Ströme auf dem Monitor erkennbar sein, die nach Zugabe von 1 mM ATP versiegen. Sind diese schlecht zu erkennen oder bleibt die Reaktion auf ATP aus, so hat sich der Patch möglicherweise zu einem Vesikel geschlossen (vgl. Abb. 3.1). Durch kurzen Luftkontakt kann das Vesikel oft wieder geöffnet werden und es kommt wieder zum inside-out Patch.

#### 3.3.4.2 Messung von Auswärtsströmen durch $K_{ATP}$ -Kanäle des $K_{IR}$ 6.2/SUR 1-Typs mit Kaliumgradienten

Die verwendete Pipettenlösung (3.3.2.1 A) enthielt 5,6 mM Kalium, die intrazelluläre Lösung IZ (3.3.2.1 C) 125 mM, sodass ohne Anlegen eines Pipettenpotentials ein Kaliumausstrom durch den Patch aus der Badlösung, also der intrazellulären Seite, in die Pipettenlösung gemessen wurde.

Zunächst wurden alle  $K_{ATP}$ -Kanäle durch Applikation von 1 mM ATP-Lösung (3.3.2.2 A) geschlossen. Das Ersetzen der ATP-Lösung durch nukleotidfreie Kontrolllösung (3.3.2.3) führte zur Öffnung der Kanäle. In diesem Stadium wurde die kanalschließende Testsubstanz zugegeben. Dieser Testphase folgte eine





**Abb.3.1. Sealbildung und Patch-Clamp Konfigurationen.** Durch Anlegen eines Unterdrucks an die Pipette bei einem Pipettenpotential von  $-20$  mV erreicht man die „cell-attached“ Konfiguration. Den „inside-out“ Patch erhält man durch Zurückziehen der Pipette und Ablösen eines Membranstücks. Entsteht hierbei ein Vesikel, so wird die Pipette kurz aus der Badlösung aufgetaucht, sodass das Vesikel geöffnet wird und wieder die inside-out Konfiguration vorliegt (verändert nach HAMILL et al., 1981)

Kontrollphase, in der wieder nukleotidfreie Kontrolllösung an den Patch gegeben wurde. Der Versuch wurde abgeschlossen durch eine erneute Applikation von 1 mM ATP, um die Kanäle wieder zu schließen.

#### 3.3.4.3 Messung von Einwärtsströmen durch $K_{ATP}$ -Kanäle von B-Zellen ohne Kaliumgradienten

Die hier verwendeten Pipetten- und IZ-Lösungen (3.3.1.1 A und C) enthielten Kaliumkonzentrationen von 140 mM beziehungsweise 146 mM. Durch Anlegen eines Pipettenpotentials von 50 mV wurden Kalium-Einwärtsströme aus der Pipette, also von der extrazellulären Membranseite, durch den Patch in die Badlösung gemessen. Zum Schließen der Kanäle wurde zu Beginn auch hier 1 mM ATP (3.3.1.2) appliziert. Die anschließend eingesetzte Kontrolllösung enthielt 1 mM ADP (3.3.1.3), was den schließenden Effekt der Testsubstanz deutlicher zutage kommen lässt. Der Testphase folgte auch hier eine Kontroll- und abschließend eine ATP-Phase.

Da die Testsubstanzen hier und unter 3.3.4.4 als Natriumsalze eingesetzt wurden, wurde der Kontroll- und der ATP-Lösung NaCl in äquimolaren Mengen zugesetzt.

### 3.3.5 Auswertung der Patch-Clamp Experimente

In folgenden Phasen des Experiments wurde die Kanalaktivität registriert: in Anwesenheit von 1 mM ATP ( $K_{ATP}$ -Kanäle geschlossen) zu Beginn und am Ende des Experiments, während der letzten 90 Sekunden der Kontrollphasen vor und nach Testsubstanz-Applikation und nach Einstellung eines neuen Gleichgewichts in Gegenwart der Testsubstanz. Die relative  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität errechnete sich aus den gemessenen Stromflüssen  $I$  in pA wie folgt:

$$(1) \quad \text{Relative Kanalaktivität} = \frac{I(\text{Testsubstanz}) - I(\text{ATP})}{I(\text{Kontrolle}) - I(\text{ATP})} * 100\%$$

#### 3.3.5.1 Statistik

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  SEM für  $n$  unabhängige Experimente. Signifikanzen wurden unter Verwendung des zweiseitigen U-Tests von Wilcoxon und von Mann und Whitney mit der Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche berechnet (WALLENSTEIN et al., 1980).  $P < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

#### 3.3.5.2 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Zur Analyse der Beziehung zwischen Substanzkonzentration und Kanalaktivität wurde folgende Funktion verwendet:

$$(2) \quad y = \frac{a - b}{1 + \left( \frac{EC_{50}}{x} \right)^n} + b$$

$y$  steht für die relative  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität,  $a$  ist der Maximalwert der relativen Kanalaktivität,  $EC_{50}$  gibt die halbmaximal-wirksame Substanzkonzentration an,  $x$  die jeweilige Substanzkonzentration,  $n$  den Steigungsparameter (Hill-Koeffizient), und  $b$  ist eine additive Konstante.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wirkung von Monokarbonsäuren auf $K_{ATP}$ -Kanäle des $K_{IR6.2}/SUR1$ -Typs in COS-Zellen

In Patch Clamp-Versuchen an Maus-B-Zellen hatten Bränström et al. (1998) an inside-out-Patches eine direkte Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle durch millimolare KIC-Konzentrationen nachgewiesen, also in einem Konzentrationsbereich, in dem KIC die Insulinfreisetzung steigert.

Durch Verwendung strukturell verwandter Substanzen sollte die Bedeutung verschiedener Strukturmerkmale für die direkte  $K_{ATP}$ -Kanalhemmung untersucht werden. KC ist ein KIC-Isomer mit unverzweigter Kohlenstoffkette. IC verfügt im Gegensatz zu KIC über keine  $\alpha$ -ständige Ketofunktion. Die Kohlenstoffkette von KIV ist um ein C-Atom kürzer als die von KIC. PPyr und PProp besitzen einen aromatischen Rest, sind somit deutlich lipophiler als KIC, wobei PPyr eine  $\alpha$ -Ketokarbonsäure ist, PProp jedoch nicht (Strukturformeln in Abb. 2.1).

Durch transiente Koexpression der Untereinheiten  $K_{IR6.2}$  und SUR1 (s. Kapitel 3.1) wurden in COS-Zellen  $K_{ATP}$ -Kanäle gebildet und in die Plasmamembran eingebaut. Diese  $K_{ATP}$ -Kanäle wurden in der inside-out-Konfiguration der Patch Clamp-Technik untersucht.

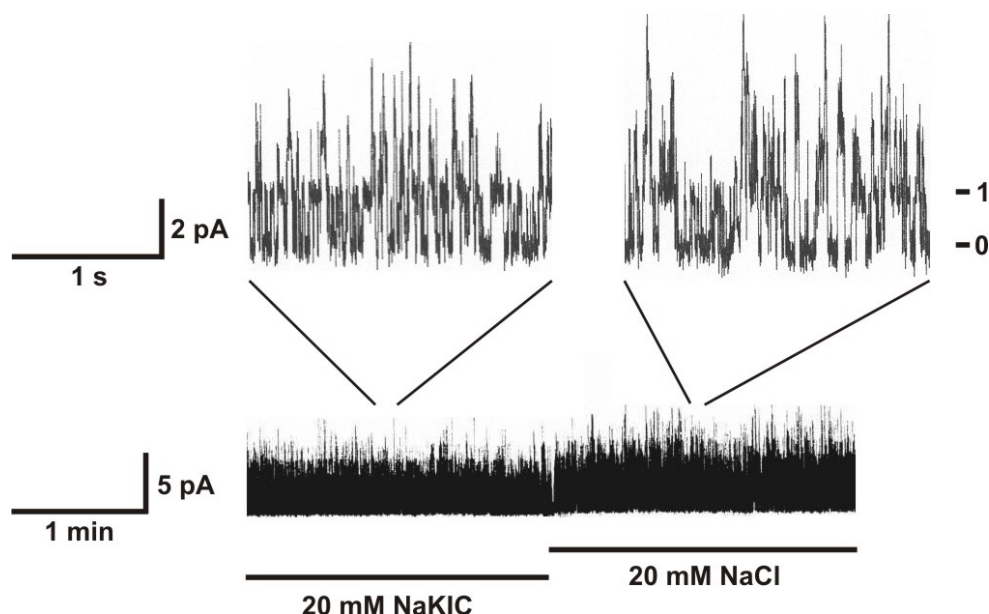
Zum Testprotokoll gehörte eine Periode mit Schließen aller  $K_{ATP}$ -Kanäle durch Applikation von 1 mM ATP in Anwesenheit von 0,7 mM freiem  $Mg^{2+}$  auf der zytosolischen Membranseite. Während der übrigen Versuchsperioden wurden keine Nukleotide appliziert. Der „Rundown“ (spontaner Rückgang der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während des Versuchszeitraums) ist bei Versuchen mit inside-out Patches oft stark und erschwert die Durchführung der Versuche beträchtlich. Der Rundown wurde dadurch berücksichtigt, dass vor und nach der Zufuhr einer Testsubstanz Kontrollperioden ohne Testsubstanz eingeschoben wurden. Der Mittelwert aus der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollperioden vor und nach Zufuhr der Testsubstanz bildete die Bezugsgröße für die weitere Auswertung. Beim Auswerten der Versuche wurde dann die gemittelte  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Perioden mit ATP als 0 % und während der Kontrollperioden als 100 % gesetzt. Relativ zu diesen Werten wurde die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität beim Einwirken einer Testsubstanz ermittelt (siehe Kapitel 3.3.5).

Im größeren Teil der Experimente ist die zweite Kontrollphase ohne Testsubstanz, die also nach Zufuhr der Testsubstanz erfolgte, ungefähr 7 Minuten lang, berücksichtigt wurden bei den Berechnungen der relativen  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität die letzten 2 Minuten dieser Phase. Bei einem kleineren Teil der Experimente ist die Kontrollphase ohne Testsubstanz, die nach Zufuhr der Testsubstanz erfolgte, nur ungefähr 3,5 Minuten lang. Im Weiteren wird diese Version der Experimente als Experimente mit kurzer 2. Kontrollphase bezeichnet. Typische Beispiele für den Versuchsablauf sind in den Abbildungen 4.3 und 4.4 gezeigt.

#### 4.1.1 Einfluss der Ketosäuren auf die Einzelkanalstromamplitude

KIC wurde in Form seines Natriumsalzes eingesetzt. Es ist bekannt, dass  $Na^+$  in millimolarer Konzentration die Einzelkanalleitfähigkeit von  $K_{ATP}$ -Kanälen beeinflusst (KAKEI et al., 1985; HORIE et al., 1987; BOLLENSDORFF et al., 2003).

Daher wurde die Versuchsanordnung so geplant, dass während der Kontroll- und der



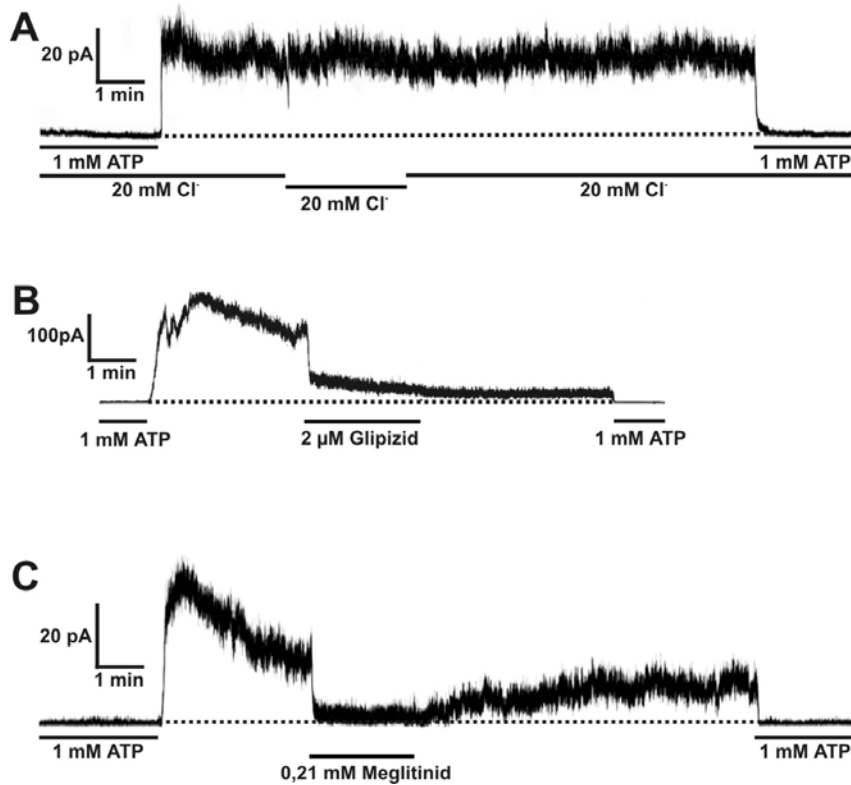
**Abb. 4.1:** Das KIC-Anion (20 mM) hat keinen Einfluss auf die Einzelkanalstromamplitude der  $K_{ATP}$ -Kanäle. Schnellschreiberregistrierung der Kaliumströme durch  $K_{ATP}$ -Kanäle vom  $K_{IR}6.2/SUR1$ -Typ in COS-Zellen in der inside-out-Konfiguration der Patch Clamp-Technik. Die Badlösung enthält 125 mM  $K^+$ , die Pipettenlösung 5,6 mM  $K^+$ . Die beim Öffnen der Kanäle resultierenden Auswärtsströme sieht man als Schreiberauslenkung nach oben. Die waagerechten Linien zeigen Substanzen an, die der IZ-Lösung (3.6.2.1 C) in den Versuchsphasen zugesetzt waren. Der obere Teil der Abbildung zeigt Ausschnitte des Experiments in höherer Auflösung. Die Einzelkanalstromamplitude, also der Betrag der Stromstärke zwischen geschlossenem Kanal (Niveau 0) und einem geöffneten Kanal (Niveau 1) unterscheidet sich in Anwesenheit von 20 mM Na-Salz von KIC nicht von der der NaCl-Kontrolle.

Testperioden dieselbe  $\text{Na}^+$ -Konzentration vorlag. In Patch Clamp-Experimenten mit wenigen (1-4) Kanälen im Patch wurde überprüft, ob auch die Anion-Formen der Testsubstanzen die Einzelkanalstromamplitude beeinflussten. Abb. 4.1 zeigt am Beispiel KIC-Anion, dass dies nicht der Fall war. Die Öffnung einzelner  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle führte im selben Experiment zu einer Einzelkanalstromamplitude von  $1,92 \pm 0,02$  pA (20 Ereignisse innerhalb des Experiments) in Anwesenheit von 20 mM NaCl und von  $1,89 \pm 0,02$  pA (30 Ereignisse innerhalb des Experiments) in Anwesenheit von 20 mM Na-Salz von KIC. Der sehr geringe Unterschied war nicht signifikant. Auch 20 mM PPyr und 20 mM KIV änderten die Einzelkanalstromamplitude nicht.

#### 4.1.2 Kontrollexperimente zur Überprüfung des Versuchsprotokolls

In Kontrollexperimenten (zur Durchführung vgl. Abb. 4.2 A) wurde anstelle der Testlösung NaCl-haltige Kontrolllösung appliziert, die der Badkammer genauso zugeführt wurde, wie es bei den Experimenten mit Testlösungen der Fall war. Die relative  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität während der Testphase im Vergleich zu den Kontrollphasen betrug  $96,6 \pm 3,2$  % für 13 unabhängige Experimente. Es machte dabei keinen Unterschied, ob es sich um Experimente mit kurzer oder mit langer 2. Kontrollphase (s. 4.1) handelte ( $97,0 \pm 4,1$  % versus  $96,4 \pm 4,4$  %).

Um zu sehen, in welchem Ausmaß die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle maximal gehemmt werden konnten, wurden der Sulfonylharnstoff Glipizid und das Sulfonylharnstoff-Analogon Meglitinid eingesetzt, und zwar in maximal wirksamen Konzentrationen. Die  $\text{K}_\text{D}$ -Werte für die Bindung an SUR1 und an B-Zellen liegen für Glipizid um 20 nM, für Meglitinid um 7  $\mu\text{M}$  (ZÜNKLER et al., 1988; DÖRSCHNER et al., 1999), der  $\text{EC}_{50}$ -Wert von Meglitinid für Patch Clamp-Experimente am inside-out Patch beträgt 0,5  $\mu\text{M}$  (SCHWANSTECHEER et al., 1994). Daher kann davon ausgegangen werden, dass sowohl 2  $\mu\text{M}$  Glipizid als auch 0,21 mM Meglitinid maximale Wirkungen zeigen. Es stellte sich heraus, dass die Wirkung von Glipizid nicht innerhalb von Minuten reversibel war (Abb. 4.2 B). Nach der Applikation von Meglitinid stieg die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität innerhalb von 5 Minuten wieder deutlich an. Die relative  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität während der Testphase im Vergleich zur  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen betrug für 0,21 mM Meglitinid  $29,5 \pm 6,8$  % für 6 unabhängige Experimente.  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle vom  $\text{K}_{\text{IR}}6.2/\text{SUR1}$ -Typ können unter den gewählten Bedingungen also auch durch SUR-Agonisten in maximalwirksamen Konzentrationen nicht vollständig blockiert werden.



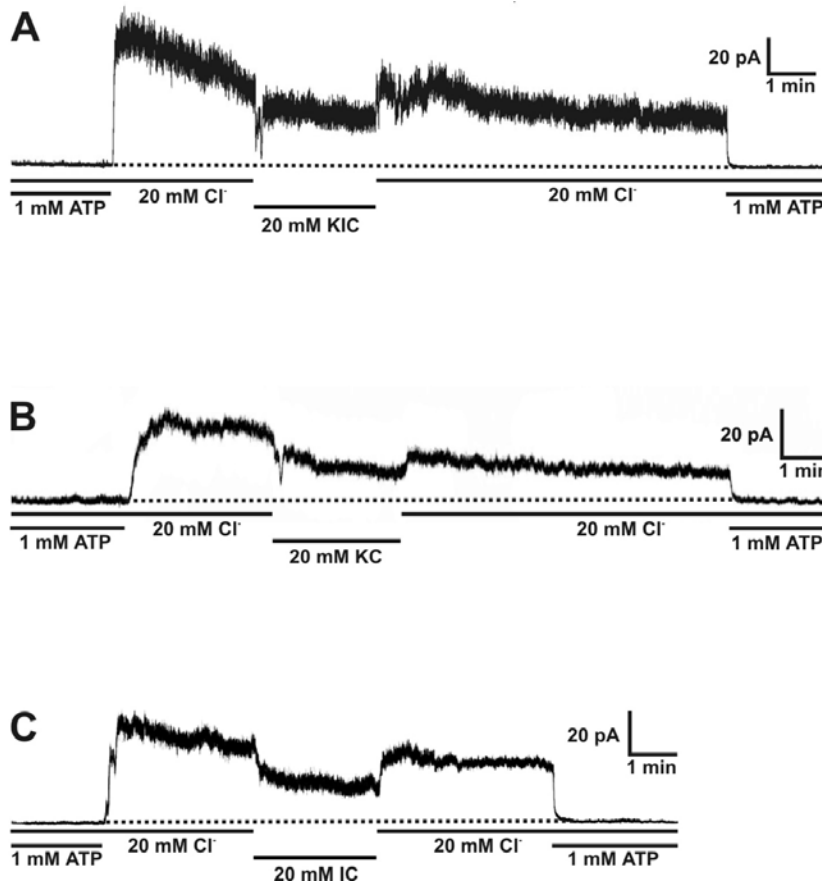
**Abb. 4.2: Wirkungen von  $\text{Cl}^-$ , Glipizid und Meglitinid auf die Öffnungsaktivität von  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanälen in COS-Zellen.** Repräsentative Schnellschreiber - Registrierungen der Kaliumströme durch  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle vom  $\text{K}_{\text{IR}}6.2/\text{SUR1}$ -Typ in der inside-out Konfiguration der Patch Clamp-Technik. Die Badlösung enthält 125 mM  $\text{K}^+$ , die Pipettenlösung 5,6 mM  $\text{K}^+$ . Die beim Öffnen der Kanäle resultierenden Auswärtsströme sieht man als Schreiber- auslenkung nach oben. Die waagerechten Li-

nien zeigen die Zeitspannen an, während der die IZ-Lösung (3.6.2.1 C) die angegebenen Substanzen enthielt. Die gepunktete Linie entspricht dem Stromfluss in Anwesenheit von 1 mM ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle geschlossen). **A:** Während der Testphase wurde Kontrolllösung mit 20 mM  $\text{Cl}^-$  aus einem anderen Becherglas zugeführt (nach unten abgesetzte waagerechte Linie). Dies änderte die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität nicht (relative  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität in der Testphase dieses Experiments: 100,5 %). **B:** 2  $\mu\text{M}$  Glipizid hemmt die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität deutlich, jedoch nicht vollständig. Die Wirkung ist innerhalb von 4 Minuten nicht reversibel. **C:** 0,21 mM Meglitinid hemmt die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität deutlich, jedoch nicht vollständig (relative  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität in der Testphase dieses Experiments 12,8 %). Die Wirkung ist jedoch schneller reversibel als in B.

#### 4.1.3 Wirkungen von KIC, KC, IC, KIV, PPyr und PProp auf die $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität in COS-Zellen

Abbildung 4.3 A zeigt ein typisches Experiment mit 20 mM KIC. In Anwesenheit von 20 mM KIC betrug die relative  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität im Vergleich zur Kontrolle  $59,0 \pm 4,1 \%$  für  $n = 12$  unabhängige Experimente, dabei machte es keinen Unterschied, ob es sich um Experimente mit kurzer oder mit langer 2. Kontrollphase (s. 4.1) handelte ( $59,5 \pm 4,9 \%$  gegenüber  $58,4 \pm 6,9 \%$ , jeweils  $n = 6$ ).

Unter Berücksichtigung der Experimente aus 4.1.2, in denen 210  $\mu\text{M}$  Meglitinid die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität auf 29,5 % senkte (als 100 % Hemmwirkung festgesetzt) und in denen die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität ohne Testsubstanz auf 96,6 % sank (als 0 % Hemm-



**Abb. 4.3:** Wirkungen von 20 mM KIC, KC und IC auf die Öffnungsaktivität von K<sub>ATP</sub>-Kanälen in COS-Zellen. Repräsentative Schnell-schreiber - Registrierungen der Kaliumströme durch K<sub>ATP</sub>-Kanäle vom K<sub>IR</sub>6.2 /SUR1-Typ in der inside-out Konfiguration der Patch Clamp-Technik. Die Badlösung enthält 125 mM K<sup>+</sup>, die Pipettenlösung 5,6 mM K<sup>+</sup>. Die beim Öffnen der Kanäle resultierenden Auswärtsströme sieht man als Schreibernachlenkung nach oben. Die waagerechten Linien zeigen die Zeitspannen an, während der die IZ-Lösung (3.6.2.1 C) die

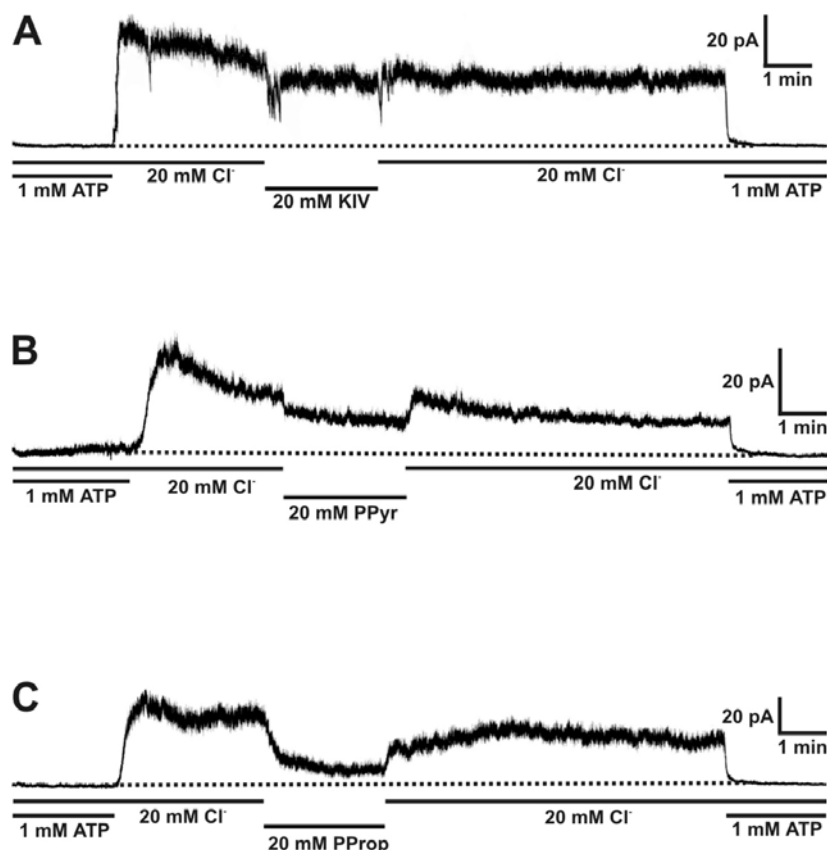
angegebenen Substanzen enthielt. Die gepunktete Linie entspricht dem Stromfluss in Anwesenheit von 1 mM ATP (K<sub>ATP</sub>-Kanäle geschlossen). KIC (A), KC (B) und IC (C) hemmen die K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität im Vergleich zur Kontrolllösung deutlich und reversibel. **A:** Die relative K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität in Anwesenheit von 20 mM KIC im Vergleich zur K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität während der Kontrollphasen beträgt in diesem Experiment 58,2 %. **B:** Die relative K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität in Anwesenheit von 20 mM KC im Vergleich zur K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität während der Kontrollphasen beträgt in diesem Experiment 56,4 %. **C:** Die relative K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität in Anwesenheit von 20 mM IC im Vergleich zur K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität während der Kontrollphasen beträgt in diesem Experiment 53,6 %.

wirkung festgesetzt) kommt man zu 56,1 % Hemmwirkung von 20 mM KIC am K<sub>IR</sub>6.2/SUR1-Kanal.

Die relative K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität, die unter 5 mM KIC beobachtet wurde ( $71,9 \pm 6,1$  %,  $n = 6$ ), entspricht 36,8 % Hemmwirkung.

Abbildung 4.3 B zeigt ein typisches Experiment mit 20 mM KC. Die relative K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität, die unter 20 mM KC beobachtet wurde ( $62,1 \pm 6,4$  %,  $n = 7$ ), entspricht 51,5 % Hemmwirkung.

Abbildung 4.3 C zeigt ein typisches Experiment mit 20 mM IC. Die relative K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität, die unter 20 mM IC beobachtet wurde ( $52,8 \pm 2,1$  %,  $n = 6$ ), entspricht 65,3 % Hemmwirkung.



**Abb. 4.4: Wirkungen von 20 mM KIV, PProp und PPyr auf die Öffnungsaktivität von  $K_{ATP}$ -Kanälen in COS-Zellen.** Repräsentative Schnellschreiber - Registrierungen der Kaliumströme durch  $K_{ATP}$ -Kanäle vom  $K_{IR}6.2$  /SUR1-Typ in der inside-out Konfiguration der Patch Clamp-Technik. Die Badlösung enthält 125 mM  $K^+$ , die Pipettenlösung 5,6 mM  $K^+$ . Die beim Öffnen der Kanäle resultierenden Auswärtsströme sieht man als Schreiberauslenkung nach oben. Die waagerechten Linien zeigen die Zeitspannen an, während der die IZ-Lösung (3.6.2.1 C) die angegebenen Substanzen enthielt. Die gepunktete Linie entspricht dem Stromfluss in Anwesenheit von 1 mM ATP ( $K_{ATP}$ -Kanäle geschlossen).

KIV (A), PPyr (B) und PProp (C) hemmen die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen deutlich und reversibel. **A:** Die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in Anwesenheit von 20 mM KIV im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen beträgt in diesem Experiment 75,3 %. **B:** Die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in Anwesenheit von 20 mM PPyr im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen beträgt in diesem Experiment 59,3 %. **C:** Die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in Anwesenheit von 20 mM PProp im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen beträgt in diesem Experiment 27,9 %.

Abbildung 4.4 A zeigt ein typisches Experiment mit 20 mM KIV. Die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität, die unter 20 mM KIV beobachtet wurde ( $78,6 \pm 2,9$  %,  $n = 11$ ; davon 5 Experimente mit kurzer 2. Kontrollphase:  $77,2 \pm 2,9$  % und 6 Experimente mit langer 2. Kontrollphase:  $79,8 \pm 4,9$  %), entspricht 26,9 % Hemmwirkung.

Abbildung 4.4 B zeigt ein typisches Experiment mit 20 mM PPyr. Die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität, die unter 20 mM PPyr beobachtet wurde ( $47,4 \pm 6,3$  %,  $n = 6$ ), entspricht 73,3 % Hemmwirkung.

Abbildung 4.4 C zeigt ein typisches Experiment mit 20 mM PProp. Die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität, die unter 20 mM PProp beobachtet wurde ( $29,1 \pm 1,5$  %,  $n = 6$ ), entspricht 100,7 % Hemmwirkung.



Testsubstanz (mM)	rel. $K_{ATP}$ -Kanal- aktivität $\pm$ SEM (%)	Hemmwirkung (%)
keine	96,6 $\pm$ 3,2	<b>0</b>
Meglitinid (0,21)	29,5 $\pm$ 6,7	<b>100</b>
KIV (20)	78,6 $\pm$ 2,9 <sup>^</sup>	<b>26,9</b>
KIC (5)	71,9 $\pm$ 6,1	<b>36,8</b>
KIC (20)	59,0 $\pm$ 4,1 <sup>+</sup>	<b>56,1</b>
KC (20)	62,1 $\pm$ 6,4 <sup>*</sup>	<b>51,5</b>
IC (20)	52,8 $\pm$ 2,1 <sup>*</sup>	<b>65,3</b>
PPyr (20)	47,4 $\pm$ 6,3	<b>73,3</b>
PProp (20)	29,1 $\pm$ 1,5 <sup>#</sup>	<b>100,7</b>

<sup>+</sup> p < 0,05 (gegen 20 mM KIV)      <sup>\*</sup> p > 0,05 (gegen 20 mM KIC)  
<sup>^</sup> p < 0,01 (gegen "keine")      <sup>#</sup> p < 0,05 (gegen 20 mM KIC)

**Tabelle 4.1: Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle des  $K_{IR6.2}/SUR1$ -Typs durch KIC, KC, IC, KIV, PPyr und PProp.** Angegeben ist die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität unter den Testsubstanzen im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen  $\pm$  SEM aus 6 – 13 unabhängigen Experimenten sowie die Hemmwirkung. Letztere Größe ergibt sich, wenn die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität der Meglitinidexperimente als 100 % und die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität der Kontrollexperimente ohne Testsubstanz als 0 % Hemmwirkung festgesetzt wird.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Alle untersuchten Monokarbonsäuren hemmen  $K_{ATP}$ -Kanäle des  $K_{IR6.2}/SUR1$ -Typs. Auch der Effekt des am schwächsten wirksamen KIV unterscheidet sich signifikant von den Kontrollexperimenten ohne Testsubstanz. 20 mM KIC ist signifikant stärker wirksam als 20 mM KIV. KC und IC unterscheiden sich in ihrer Hemmwirkung nicht von KIC. Die beiden aromatisch substituierten Testsubstanzen PPyr und PProp hemmen die  $K_{ATP}$ -Kanäle am stärksten.

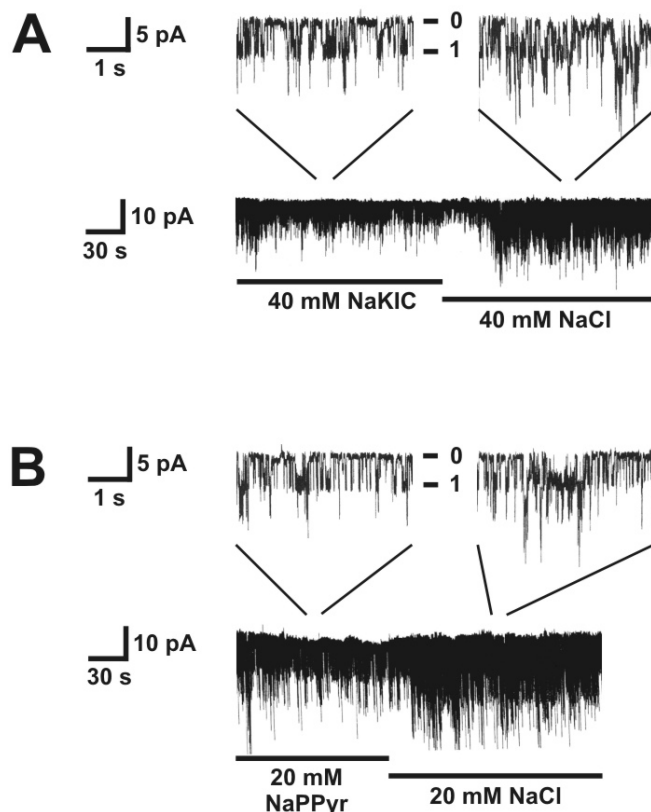
## 4.2 Hemmung der $K_{ATP}$ -Kanalaktivität pankreatischer Maus-B-Zellen durch $\alpha$ -Ketomonokarbonsäuren

In Patch Clamp-Experimenten an inside-out Patches von Maus-B-Zellen wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmung von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch die Ketosäuren KIC, KC, KIV und PPyr erstellt. Pankreasinseln wurden durch Collagenaseandau gewonnen und in Einzelzellen dissoziiert (s. Kap. 3.2.3). Die  $K_{ATP}$ -Kanäle wurden in der inside-out Konfiguration der Patch Clamp-Technik untersucht. Zum Testprotokoll gehörte eine Periode mit Schließen aller  $K_{ATP}$ -Kanäle durch Applikation von 1 mM ATP in Anwesenheit von 0,7 mM freiem  $Mg^{2+}$  auf der zytosolischen Membranseite. Während der übrigen Versuchsperioden wurde 1 mM ADP in Anwesenheit von 0,7 mM freiem  $Mg^{2+}$  auf der zytosolischen Membranseite appliziert. Der Rundown (spontaner Rückgang der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während des

Versuchszeitraums) wurde dadurch berücksichtigt, dass vor und nach der Zufuhr einer Testsubstanz Kontrollperioden ohne Testsubstanz eingeschoben wurden. Beim Auswerten der Versuche wurde dann die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Perioden mit ATP als 0 % und während der Kontrollperioden als 100 % gesetzt. Relativ zu diesen Werten wurde die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität beim Einwirken einer Testsubstanz ermittelt (siehe Kapitel 3.3.5). Ein typischer Versuchsablauf ist in Abbildung 4.7 A gezeigt.

#### 4.2.1 Einfluss auf die Einzelkanalstromamplitude

In Patch Clamp-Experimenten mit wenigen (1-4) Kanälen im Patch wurde überprüft, ob die Anion-Formen der Testsubstanzen die Einzelkanalstromamplitude beeinflussten. Abb. 4.5 zeigt am Beispiel der KIC und PPyr-Anionen, dass dies nicht der Fall war. Die Öffnung einzelner  $K_{ATP}$ -Kanäle führte im selben Experiment zu einer Einzelkanalstromamplitude von  $3,64 \pm 0,02$  pA (90 Ereignisse innerhalb des Experiments) in Anwesenheit von 40 mM NaCl und von  $3,64 \pm 0,03$  pA (90



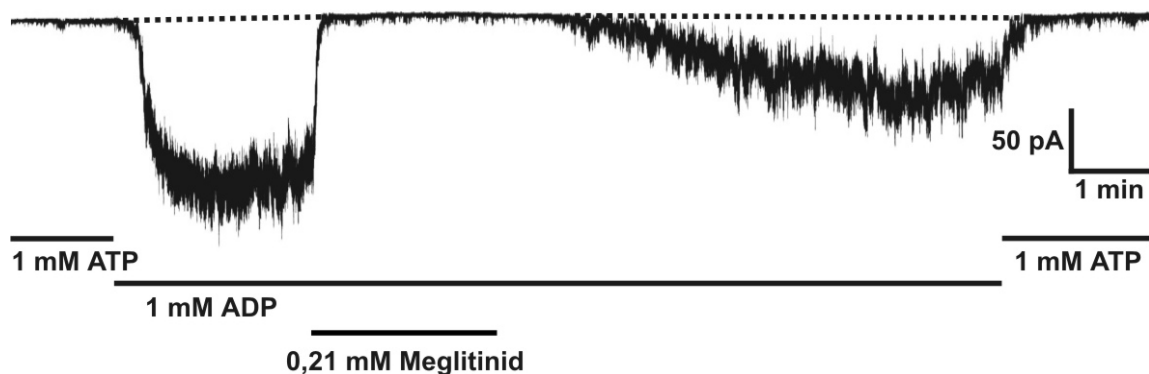
**Abb. 4.5: Einfluss der KIC- und PPyr-Anionen auf die Einzelkanalstromamplitude der  $K_{ATP}$ -Kanäle in Anwesenheit von 1 mM ADP.** Schnellschreiberregistrierung der Kaliumströme durch  $K_{ATP}$ -Kanäle von B-Zellen aus Maus-Pankreasinseln in der inside-out Konfiguration der Patch Clamp-Technik. Zwischen Pipetten- und Badlösung besteht kein Kaliumgradient, durch Anlegen eines Pipettenpotentials von 50 mV resultieren beim Öffnen der Kanäle Einwärtsströme, dargestellt als Schreiberauslenkung nach unten. Die waagrechten Linien zeigen Substanzen an, die der IZ-Lösung (3.6.1.1 C) in den Versuchsphasen zugesetzt waren. Die oberen Teile der Abbildungen A und B zeigen Ausschnitte der Experimente in höherer Auflösung. In den gezeigten Versuchsphasen waren 1 mM ADP und 0,7 mM freies  $Mg^{2+}$

zugegen. Die Einzelkanalstromamplitude, also der Betrag der Stromstärke zwischen geschlossenem Kanal (Niveau 0) und einem geöffneten Kanal (Niveau 1) unterscheidet sich in Anwesenheit von 40 mM Na-Salz von KIC (A) bzw. 20 mM Na-Salz von PPyr (B) nicht von den jeweiligen NaCl-Kontrollen.

Ereignisse innerhalb des Experiments) in Anwesenheit von 40 mM Na-Salz von KIC. Die Öffnung einzelner Kanäle führte im selben Experiment in Anwesenheit von 20 mM NaCl zu einer Einzelkanalstromamplitude von  $3,65 \pm 0,03$  pA (90 Ereignisse innerhalb des Experiments) und von  $3,62 \pm 0,03$  pA (90 Ereignisse innerhalb des Experiments) in Anwesenheit von 20 mM Na-Salz von PPyr. Der geringe Unterschied war nicht signifikant.

#### 4.2.2 Maximalwirkung von Meglitinid in Anwesenheit von ADP (1 mM)

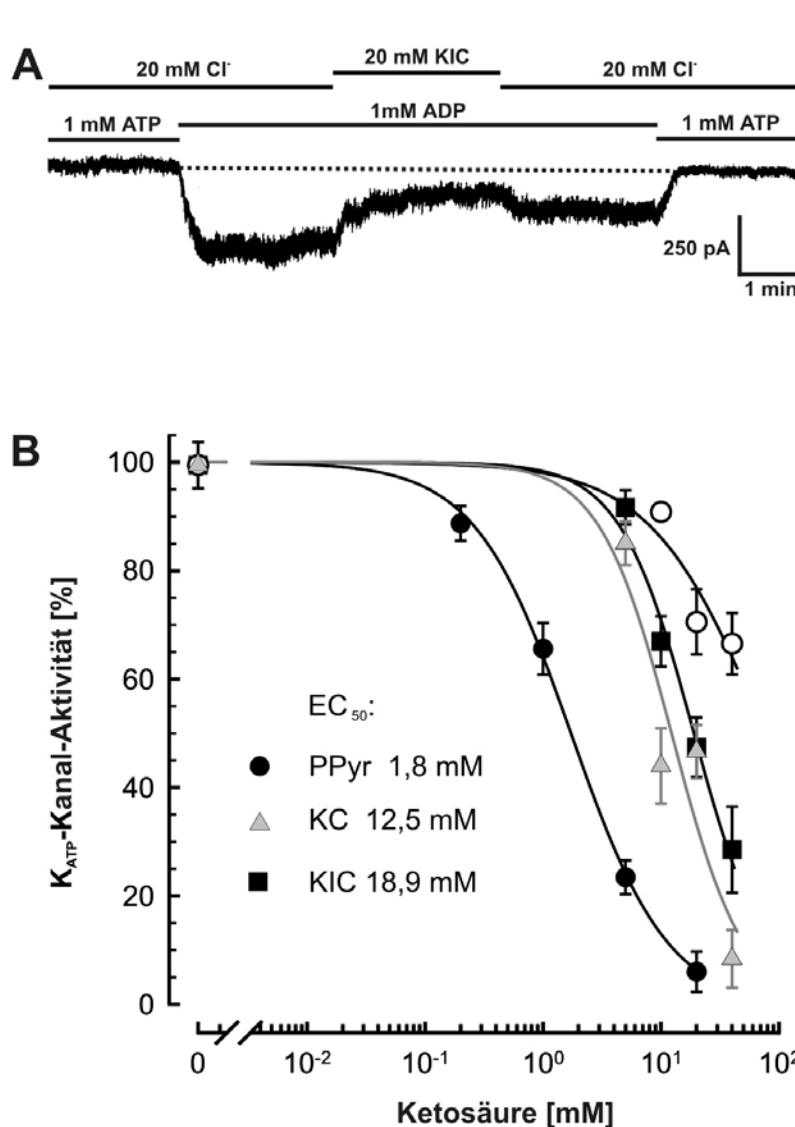
Um zu sehen, in welchem Ausmaß die  $K_{ATP}$ -Kanäle maximal gehemmt werden konnten, wurde das Sulfonylharnstoff-Analogon Meglitinid eingesetzt, und zwar in maximal wirksamer Konzentration (vgl. 4.1.2). Abbildung 4.6 zeigt ein typisches Experiment mit 0,21 mM Meglitinid. Nach der Applikation von Meglitinid stieg die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität innerhalb von 5 Minuten wieder deutlich an. Die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Testphase im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen betrug für 0,21 mM Meglitinid  $0,3 \pm 0,5$  % für 6 unabhängige Experimente. Meglitinid kann in Anwesenheit von 1 mM ADP und 0,7 mM freiem  $Mg^{2+}$  den  $K_{ATP}$ -Kanal also vollständig blockieren.



**Abb. 4.6: Wirkung von Meglitinid auf die Öffnungsaktivität von  $K_{ATP}$ -Kanälen in Maus-B-Zellen in Anwesenheit von 1 mM ADP.** Schnellschreiberregistrierung der Kaliumströme durch  $K_{ATP}$ -Kanäle in B-Zellen aus Mauspankreasinseln in der inside-out Konfiguration der Patch Clamp-Technik. Zwischen Bad- und Pipettenlösung besteht kein Kaliumgradient, durch Anlegen eines Pipettenpotentials von 50 mV resultieren beim Öffnen der Kanäle Einwärtsströme, dargestellt als Schreiberauslenkung nach unten. Die waagerechten Linien zeigen die Zeitspannen an, während der die IZ-Lösung (3.6.2.1 C) die angegebenen Substanzen enthielt. Die gepunktete Linie entspricht dem Stromfluss in Anwesenheit von 1 mM ATP ( $K_{ATP}$ -Kanäle geschlossen). Über die gesamte Versuchsdauer hinweg enthielt die Badlösung 0,7 mM freies Magnesium. 0,21 mM Meglitinid hemmt die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität vollständig.

### 4.2.3 Konzentrations-Wirkungsbeziehung für KIC, KC, KIV und PPyr

In Abbildung 4.7 ist der Einfluss der Ketosäuren KIC, KC, KIV und PPyr auf die  $K_{ATP}$ -Kanäle pankreatischer Maus-B-Zellen dargestellt. Teil A der Abbildung zeigt den Ablauf eines typischen Einzelexperiments mit KIC. Abbildung 4.7 B zeigt die Konzentrationsabhängigkeit für die Hemmwirkung der Ketosäuren. Die halbmaximal



**Abb. 4.7: Konzentrationsabhängige Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität von pankreatischen Maus-B-Zellen durch KIC, KC, KIV und PPyr in Anwesenheit von 1 mM ADP.**

**A:** Schnellschreiberregistrierung der Kaliumströme durch  $K_{ATP}$ -Kanäle in B-Zellen aus Mauspankreasinseln in der inside-out Konfiguration der Patch Clamp-Technik. Zwischen Bad- und Pipettenlösung besteht kein Kaliumgradient, durch Anlegen eines Pipettenpotentials von 50 mV resultieren beim Öffnen der Kanäle Einwärtsströme, dargestellt als Schreiberablenkung nach unten. Die waagerechten Linien zeigen die Zeitspannen an, während der die IZ-Lösung (3.6.2.1 C) die angegebenen Substanzen enthielt. Die gepunktete Linie entspricht dem Stromfluss in Anwesenheit von 1 mM ATP ( $K_{ATP}$ -Kanäle geschlossen).

geschlossenen). Über die gesamte Versuchsdauer hinweg enthielt die Badlösung 0,7 mM freies Magnesium. Die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in Anwesenheit von 20 mM KIC im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen beträgt in diesem Experiment 48,3 %.

**B:** Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für KIC (■), KC (▲), KIV (○) und PPyr (●). Entsprechend dem in A abgebildeten Versuchsverlauf wurde die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in Anwesenheit der Testsubstanzen zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen ins Verhältnis gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (falls größer als das Symbol) aus 4-7 unabhängigen Experimenten sowie die  $EC_{50}$ -Werte (halbmaximal wirksame Konzentrationen).

wirksame Konzentration ( $EC_{50}$ ) liegt für PPyr bei 1,8 mM, für KC bei 12,5 mM und für KIC bei 18,9 mM. 40 mM KIV senkte die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität auf lediglich 66,5 %; da keine Messungen über 40 mM hinaus durchgeführt wurden, ist kein  $EC_{50}$ -Wert zu ermitteln.

Wie aus der Wirksamkeit der untersuchten Substanzen in den Experimenten aus 4.1.3 zu erwarten ist, hemmt PPyr den  $K_{ATP}$ -Kanal schon in deutlich niedrigeren Konzentrationen als die übrigen Ketosäuren. Die Konzentrations-Wirkungskurven von KIC und KC liegen sehr nah beieinander, während KIV den  $K_{ATP}$ -Kanal am schwächsten hemmt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Patch Clamp-Experimente an Maus-B-Zellen

Die Gewinnung der Einzelzellen für die Patch Clamp-Experimente geschah durch Schütteln der isolierten Maus-Pankreasinseln in einem kalziumfreien Medium (vgl. Kapitel 3.2.3). Anschließend wurden die Zellen kultiviert. Zu Beginn der Patch Clamp-Experimente waren die Zellen kugelförmig und hatten einen Durchmesser von ca. 15 bis 20  $\mu\text{m}$ . Es muss zunächst diskutiert werden, welcher Zelltyp letztendlich in den Patch Clamp-Untersuchungen getestet wurde.

Die Langerhans Inseln des Mauspankreas bestehen zu 80 % aus Insulin produzierenden B-Zellen (synonym  $\beta$ -Zellen; GEPTS et al., 1960; HELLMAN, 1965), den Rest bilden Glukagon sezernierende A-Zellen (Synonym  $\alpha$ -Zellen), Somatostatin freisetzende D-Zellen (synonym  $\delta$ -Zellen) und PP-Zellen, die das Pankreatische Polypeptid bilden. Aus technischen Gründen konnten die untersuchten Zellen in meinen Versuchen nicht durch Immunfluoreszenznachweis der Hormone identifiziert werden. Auf die Unterscheidung der verschiedenen Inselzell-Typen durch Applikation unterschiedlich konzentrierter Glukoselösungen in der cell-attached Konfiguration wurde aus folgendem Grund verzichtet: Die Patche der Inselzellen waren meistens nicht über einen längeren Zeitraum stabil. Sehr viele Experimente scheiterten daran, dass durch einen starken Rundown bereits nach wenigen Minuten keine  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität übrig blieb, die unsere Testsubstanzen hätten hemmen können. Ebenso kam es oft zum plötzlichen Auftreten von Leckströmen und dem Verlust des Gigaseals, sodass die Versuchsdauer möglichst kurz gehalten werden musste, um zu einer ausreichenden Anzahl an Experimenten zu kommen.

Sowohl von A- als auch von D- und PP-Zellen ist bekannt, dass sie  $K_{\text{ATP}}$ -Kanäle besitzen (LIU et al., 1999; QUESADA et al., 1999; BARG et al., 2000). QUESADA et al. (1999) befanden die Anzahl der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanäle in A-Zellen von Mäusen für so gering, dass sie keine physiologische Bedeutung haben könnten. Die Autoren beobachteten nur eine sehr schwache Bindung eines fluoreszenzmarkierten Glibenclamidderivates an A-Zellen und keine nennenswerten Effekte des Sulfonylharnstoffes Tolbutamid und des Kaliumkanalöffners Diazoxid auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration der A-Zellen. BARG et al. (2000) gaben für Mausinseln an, dass eine A-Zelle  $< 150$   $K_{\text{ATP}}$ -

Kanäle und eine B-Zelle rund 7000  $K_{ATP}$ -Kanäle enthält. A-Zellen haben bei einem Zelldurchmesser von ca. 10,6  $\mu\text{m}$  eine Oberfläche von rund 350  $\mu\text{m}^2$ , sodass die  $K_{ATP}$ -Kanaldichte bei 0,4  $K_{ATP}$ -Kanälen pro  $\mu\text{m}^2$  liegt. B-Zellen sind mit einem Durchmesser von durchschnittlich 14,8  $\mu\text{m}$  größer als A-Zellen. Ihre Oberfläche errechnet sich zu rund 690  $\mu\text{m}^2$ , sodass sich eine  $K_{ATP}$ -Kanaldichte von rund 10 Kanälen pro  $\mu\text{m}^2$  ergibt. Die Fläche eines inside-out Patches in der Patchpipette liegt bei dem von uns eingestellten Pipettenwiderstand (5-7  $\text{M}\Omega$ ) nach Untersuchungen von SAKMANN und NEHER (1983) bei 2 bis 3  $\mu\text{m}^2$ . Somit wird im inside-out Patch einer Maus-A-Zelle höchstens ein  $K_{ATP}$ -Kanal erwartet, im Patch einer B-Zelle hingegen 15 bis 40  $K_{ATP}$ -Kanäle. Unsere Experimente wurden an Patches durchgeführt, in denen 3 bis 50 (Mittelwert: 16)  $K_{ATP}$ -Kanäle in Erscheinung traten. Zusätzlich wurde ein Experiment an einem Patch mit 100  $K_{ATP}$ -Kanälen durchgeführt. 95 % der Experimente fand an Patches mit 5 oder mehr  $K_{ATP}$ -Kanälen statt. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass meine Messungen nicht durch Einbeziehen von Patches von A-Zellen verfälscht wurden.

Untersuchungen über die  $K_{ATP}$ -Kanaldichte in D- und in PP-Zellen der Langerhans Inseln von Mäusen liegen nicht vor. Beide Zelltypen sind mit 10 bis 12  $\mu\text{m}$  Durchmesser deutlich kleiner als die durchschnittlich 14,8  $\mu\text{m}$  Durchmesser aufweisenden B-Zellen (LIU et al., 1999; BARG et al., 2000). Tolbutamid bewirkt bei D- und PP-Zellen einen Anstieg und Diazoxid einen Abfall der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (LIU et al., 1999; QUESADA et al., 1999), was darauf schließen lässt, dass die  $K_{ATP}$ -Kanaldichte höher ist als in A-Zellen. Der Beitrag von D- und PP-Zellen zu meinen Patch Clamp-Untersuchungen dürfte jedoch zu vernachlässigen sein, weil BARG et al. (2000) fanden, dass der Anteil von D- und PP-Zellen in Einzelzellpräparationen nur 2 bzw. 5 % beträgt. Die Autoren stellten die Einzelzellpräparationen mit der gleichen Methodik her wie ich (Kapitel 3.2) und sie verwendeten ebenfalls NMRI-Mäuse (vgl. 3.2.2).

## **5.2 Monokarbonsäuren hemmen $K_{ATP}$ -Kanäle durch Bindung an SUR1**

Meine Patch Clamp-Ergebnisse zeigen, dass KIC und strukturell verwandte Monokarbonsäuren sowohl transient exprimierte (siehe 4.1) als auch native (siehe 4.2)  $K_{ATP}$ -Kanäle hemmen. Wie im Kapitel 1.2.1 besprochen wurde, bestehen die in meiner Arbeit untersuchten  $K_{ATP}$ -Kanäle außer aus der porenbildenden Untereinheit ( $\text{K}_{IR6.2}$ ) noch aus der regulatorischen Untereinheit SUR1 (Sulfonylurea Receptor =

SUR; SUR1 = SUR-Subtyp1). SUR1 enthält eine hochaffine Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe, wie z.B. Glibenclamid. Der  $K_{ATP}$ -Kanal kann von Sulfonylharnstoffen oder Sulfonylharnstoff-Analoga (z.B. das Benzoesäurederivat Meglitinid) durch Binden an die SUR1-Untereinheit geschlossen werden. Der  $K_{ATP}$ -Kanal der B-Zelle kann aber auch durch Substanzen (z.B. ATP oder Phentolamin, COOK und HALES, 1984; PROKS et al., 1997) gehemmt werden, die direkt mit der porenbildenden Untereinheit  $K_{IR6.2}$  interagieren.

RUSTENBECK et al. (1999) beobachteten an inside-out Patches von Maus-B-Zellen, dass eine KIC-induzierte  $K_{ATP}$ -Kanalhemmung durch den Zytochromoxidase-hemmstoff Na-Azid zumindest teilweise wieder aufgehoben wurde. Die Autoren interpretierten daher die KIC-induzierte Hemmung als indirekt. Sie hatten nämlich beobachtet, dass an der zytoplasmatischen Seite des Patches noch Mitochondrien anhafteten. KIC konnte die ATP-Produktion dieser Mitochondrien stimuliert haben und mittels dieses ATP den  $K_{ATP}$ -Kanal gehemmt haben. Im Gegensatz zu dieser Interpretation fanden BRÄNSTRÖM et al. (1998) Hinweise für einen direkten Hemmeffekt von KIC auf den  $K_{ATP}$ -Kanal von B-Zellen aus Mausinseln. Insbesondere verminderte KIC am inside-out Patch in Anwesenheit von Na-Azid sehr wohl die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität.

Für einen direkten Hemmeffekt von KIC sprechen auch bisher nicht veröffentlichte Bindungsexperimente, die von G. Wittenberg in unserem Institut durchgeführt wurden (Tabelle 5.1; SCHMELING et al., 2002). Die  $K_D$ -Werte der Testsubstanzen liegen im millimolaren Bereich, also binden sie im selben Konzentrationsbereich sowohl an SUR1 als auch an SUR2B, in dem sie auch die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität hemmen. Bei dem Vergleich der Werte ist zu beachten, dass ein  $K_{ATP}$ -Kanal vier SUR-Untereinheiten besitzt, von denen jedoch nur eine durch einen Sulfonylharnstoff oder eine analog wirkende Substanz besetzt werden muss, damit sich der Kanal schließt (DÖRSCHNER et al., 1999). Die für meine Testsubstanzen beobachteten  $EC_{50}$ -Werte zur  $K_{ATP}$ -Kanalhemmung lagen etwa 5fach niedriger als die entsprechenden  $K_D$ -Werte bei der Bindung. Die von mir untersuchten Monokarbonsäuren hemmen also offenbar die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch Bindung an die SUR-Untereinheit. Die große Ähnlichkeit der  $K_D$ -Werte für HIT-SUR1 (gleichzeitig  $K_{IR6.2}$  anwesend) und für allein in der Membran vorkommenden SUR1 zeigt, dass  $K_{IR6.2}$  die Bindung nicht wesentlich beeinflusst (Tabelle 5.1). Ferner fand sich kein besonderer Unterschied



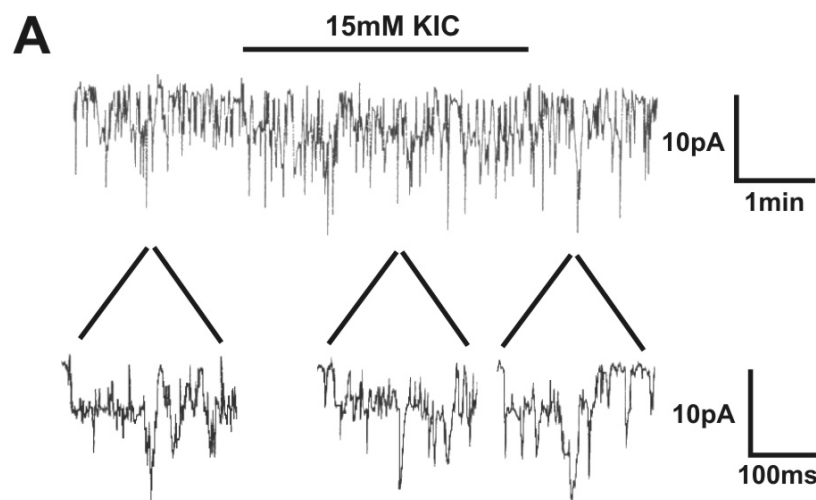
	HIT-SUR1	SUR1	SUR2B
Testsubstanz	$K_D$ [mM]	$K_D$ [mM]	$K_D$ [mM]
KIC	$46,9 \pm 1,1$ (-1,27)	$57,4 \pm 4,0$ (-1,10)	$52,9 \pm 2,0$ (-1,12)
IC	$45,6 \pm 1,0$ (-1,13)	$53,1 \pm 0,6$ (-1,05)	$25,2 \pm 1,0$ (-1,05)
KC	$24,9 \pm 0,9$ (-1,08)	$25,6 \pm 0,7$ (-1,05)	$21,7 \pm 1,8$ (-1,09)
KIV	n.g.	$205 \pm 14$ (-1,12)	$246 \pm 11$ (-0,96)
PPyr	$12,8 \pm 0,4$ (-1,06)	$15,1 \pm 0,3$ (-1,10)	$12,7 \pm 0,7$ (-1,12)
PProp	$18,5 \pm 0,7$ (-0,96)	$19,2 \pm 0,9$ (-1,00)	$13,1 \pm 1,0$ (-1,11)

**Tab. 5.1: Monokarbonsäuren binden an die Sulfonylharnstoffbindungsstelle von Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR).** Die Tabelle zeigt die  $K_D$ -Werte, die aus den Ergebnissen kompetitiver Hemmversuche errechnet wurden. In diesen Versuchen mit mikrosomalen Membranen wurde [ $^3$ H]-Glibenclamid aus seiner Bindung an den SUR1 durch meine Testsubstanzen verdrängt, oder es wurde [ $^3$ H]-P1075 aus seiner Bindung an SUR2B verdrängt. Die Messungen an SUR1 wurden einmal an mikrosomalen Membranen von HIT-T15-Zellen vorgenommen. Dabei handelt es sich um eine B-Zell-Linie, die von sich aus  $K_{ATP}$ -Kanäle des  $K_{IR6.2}$ /SUR1-Typs ausbildet. Zum anderen wurden mikrosomale Membranen von COS-Zellen, die SUR1 oder SUR2B transient exprimierten, eingesetzt. Die  $K_D$ -Werte wurden nach CHENG und PRUSOFF (1974) aus den  $EC_{50}$ -Werten dieser Bindungsexperimente berechnet. Die  $K_D$ -Werte sind Mittelwerte aus 4-6 unabhängigen Kurven. Die Mittelwerte der Hillkoeffizienten sind in Klammern angegeben. Diese Experimente wurden von G. Wittenberg (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig) durchgeführt (SCHMELING et al., 2002). n.g., nicht gemessen

bei Bindung an SUR1 verglichen mit der Bindung an SUR2B. Die getesteten Monokarbonsäuren zeigen also keine SUR1-Selektivität. Damit verhalten sich die getesteten Monokarbonsäuren wie das Sulfonylharnstoff-Analogon Meglitinid, das ebenfalls ein Monokarbonsäurederivat ohne SUR1-Selektivität ist. Die im Vergleich zu den von uns untersuchten Monokarbonsäuren stärkere Bindungsaffinität und größere Wirkpotenz von Meglitinid liegt sehr wahrscheinlich an der viel höheren Lipophilie von Meglitinid. Anders als Monokarbonsäuren sind Sulfonylharnstoffe wie z.B. Glibenclamid, Glipizid und Tolbutamid SUR1-selektiv, ihre Bindung an SUR1 ist um den Faktor 100 bis 500 stärker als ihre Bindung an SUR2-Subtypen (DÖRSCHNER et al., 1999).

Die Bindungsaffinitäten ( $1/K_D$ ) der Monokarbonsäuren nehmen in folgender Reihenfolge zu: KIV < KIC < IC < KC < PProp < PPyr (Tabelle 5.1). Dieser Reihenfolge entspricht die Reihenfolge der Zunahme der Hemmwirkung am  $K_{ATP}$ -Kanal ( $1/EC_{50}$ ): KIV < KIC < KC < PPyr (Abb. 4.4).

B.J. Züñker (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM) testete die KIC-Wirkung auf  $K_{IR6.2}$ - $K_{ATP}$ -Kanäle in Abwesenheit der SUR-Untereinheit (SCHMELING et al., 2002). Solche Untersuchungen werden dadurch erschwert, dass die alleinige Expressierung der porenbildenden Untereinheit  $K_{IR6.2}$  keine funktionsfähigen  $K_{ATP}$ -Kanäle ausbildet. Als Grund hierfür wird angenommen, dass ein Retentionssignal im  $K_{IR6.2}$ -Protein den Einbau in die Plasmamembran verhindert (SCHWAPPACH et al., 1998). Bei der Koexpression von  $K_{IR6.2}$  und SUR1 hingegen wird das Retentionssignal verdeckt und funktionsfähige  $K_{ATP}$ -Kanäle werden in die Plasmamembran eingebaut. TUCKER et al. stellten 1997 fest, dass einige der trunkierten Varianten der porenbildenden Untereinheit, wie z.B.  $K_{IR6.2}\Delta 26$  mit Fehlen der 26 endständigen Aminosäuren des C-Terminus, in der Plasmamembran Kaliumkanäle bilden, die durch ATP gehemmt werden, also  $K_{ATP}$ -Kanäle sind. B.J. Züñker untersuchte die Wirksamkeit von 15 mM KIC an  $K_{IR6.2}\Delta 26$ - $K_{ATP}$ -Kanälen



**Abb. 5.1: Das KIC-Anion (15 mM) hat keinen Einfluss auf die  $K_{IR6.2}$ -Untereinheit der  $K_{ATP}$ -Kanäle.** A: Schnellschreiberregistrierung der Kaliumströme durch  $K_{ATP}$ -Kanäle vom  $K_{IR6.2}\Delta 26$ -Typ in COS-Zellen in der inside-out Konfiguration der Patch Clamp-Technik. Zwischen Pipetten- und Badlösung besteht kein Kaliumgradient, durch Anlegen eines Pipettenpotentials von 60 mV resultieren beim Öffnen der Kanäle Einwärtsströme, dargestellt als Schreiberauslässe nach unten. Die waagerechten Linien zeigen die Zeitspannen an, während der die IZ-Lösung (3.6.2.1 C) die angegebenen Substanzen enthielt. Der untere Teil der Abbildung A zeigt Ausschnitte des Experiments in höherer Auflösung. In den gezeigten Versuchsphasen war 0,7 mM freies  $Mg^{2+}$  zugegen. B: Angegeben ist die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität unter den Testsubstanzen im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Experimenten. Die Untersuchungen wurden von B.J. Züñker (BfArM) durchgeführt (SCHMELING et al., 2002).

**B**

Testsubstanz (mM)	rel. $K_{ATP}$ -Kanalaktivität $\pm$ SEM (%)
Cl (15)	100
KIC (15)	96,8 $\pm$ 8,6
ATP (0,3)	58,6 $\pm$ 8,4

gen die Zeitspannen an, während der die IZ-Lösung (3.6.2.1 C) die angegebenen Substanzen enthielt. Der untere Teil der Abbildung A zeigt Ausschnitte des Experiments in höherer Auflösung. In den gezeigten Versuchsphasen war 0,7 mM freies  $Mg^{2+}$  zugegen. B: Angegeben ist die relative  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität unter den Testsubstanzen im Vergleich zur  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität während der Kontrollphasen  $\pm$  SEM aus 5 unabhängigen Experimenten. Die Untersuchungen wurden von B.J. Züñker (BfArM) durchgeführt (SCHMELING et al., 2002).

(Abb. 5.1). KIC reduzierte die Öffnungsaktivität dieser Kanäle im Vergleich zur Chloridkontrolllösung nicht. Dagegen hemmte ATP (0,3 mM) die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität stark. Diese Ergebnisse zeigen, dass KIC keinen direkten Effekt auf die porenbildende Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle hat. Somit muss die KIC-induzierte direkte Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals vom  $K_{IR6.2}/SUR1$ -Typ, des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle, durch Interaktion mit SUR1 zustande kommen. Dabei erfolgt die Wirkung offenbar durch Binden an dieselbe Bindungsstelle, an die auch Sulfonylharnstoffe und Analoga binden, wie die Bindungsstudien zeigen (Tab. 5.1).

### 5.3 Struktur-Wirkungsbeziehung der Monokarbonsäuren

Die Strukturformeln der untersuchten Monokarbonsäuren sind in Abb. 2.1 dargestellt. Die besonderen Strukturmerkmale von KIC sind eine zur Karboxylgruppe benachbarte Ketofunktion und eine endständige Verzweigung der Kohlenstoffkette. IC unterscheidet sich von KIC durch das Fehlen der  $\alpha$ -Ketofunktion. In den Patch Clamp-Experimenten an rekombinanten  $K_{IR6.2}/SUR1$ - $K_{ATP}$ -Kanälen (Kapitel 4.1, Tabelle 4.1) unterscheidet sich die kanalhemmende Wirkung von 20 mM IC nicht signifikant von derjenigen von 20 mM KIC. In diesen Experimenten hemmt auch 20 mM KC, das unverzweigte Isomer von KIC,  $K_{ATP}$ -Kanäle ebenso stark wie 20 mM KIC (Tab. 4.1). In den Patch Clamp-Experimenten mit  $K_{ATP}$ -Kanälen von Maus-B-Zellen liegen die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für KC und KIC dicht beieinander (Abb. 4.7). Die Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität ist also weder von der  $\alpha$ -ständigen Ketofunktion noch von der Verzweigung der Kohlenstoffkette abhängig.

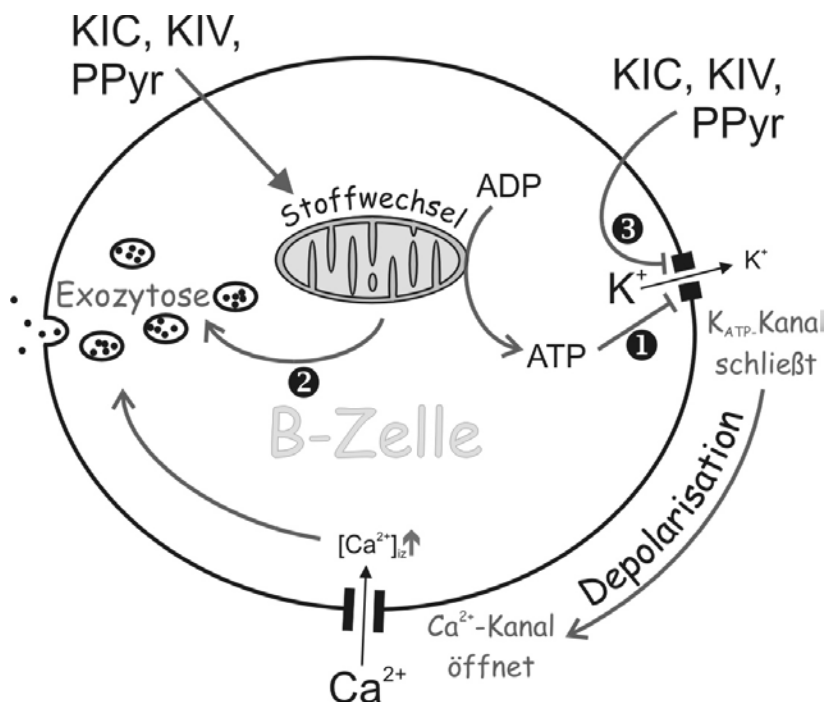
KIV ist im Vergleich zu KIC in seiner Kohlenstoffkette um eine Methylengruppe kürzer und somit weniger lipophil. KIV zeigt in den Patch Clamp-Experimenten mit rekombinanten  $K_{IR6.2}/SUR1$ - $K_{ATP}$ -Kanälen (Tab. 4.2) und mit nativen  $K_{ATP}$ -Kanälen von Maus-B-Zellen (Abb. 4.7) eine deutlich schwächere Hemmwirkung als KIC. Dazu passen die Bindungsexperimente von G. Wittenberg (Kapitel 5.2, Tab. 5.1), die für KIV eine schwächere Bindung an SUR1 und SUR2B zeigen als für KIC. PPyr trägt, verglichen mit KIC, anstelle der endständigen Isopropyl-Verzweigung die aromatische Phenylgruppe, was den lipophilen Molekülteil vergrößert. PProp verfügt ebenfalls über diesen aromatischen Rest, außerdem fehlt dem Molekül die  $\alpha$ -ständige Ketofunktion. PProp und PPyr hemmen in den Patch Clamp-Experimenten die rekombinanten  $K_{IR6.2}/SUR1$ - $K_{ATP}$ -Kanäle viel stärker als KIC (Tab. 4.1). Auch in den Patch Clamp-Experimenten mit nativen  $K_{ATP}$ -Kanälen von Maus-B-Zellen erwies

sich PPyr als ein stärkerer  $K_{ATP}$ -Kanalhemmer als KIC (Abb. 4.7). Insgesamt zeigt sich also, dass Monokarbonsäuren  $K_{ATP}$ -Kanäle um so stärker hemmen je lipophiler sie sind.

#### 5.4 Bedeutung der direkten $K_{ATP}$ -Kanalhemmung durch Monokarbonsäuren für deren insulinfreisetzende Wirkung

Die durch  $\alpha$ -Ketomonokarbonsäuren (z.B. KIC) induzierte Stoffwechselaktivierung in B-Zellen steigert die Insulinsekretion (Abb. 5.2). Die in Kapitel 4.2 (Abb. 4.7) dargelegten Ergebnisse und die Diskussion in Kapitel 5.2 zeigen eindeutig, dass KIC und verwandte  $\alpha$ -Ketomonokarbonsäuren den  $K_{ATP}$ -Kanal auch direkt durch Binden an SUR1 hemmen können. Ist dieser direkte Effekt an der Stimulation der Insulinsekretion durch KIC und verwandte  $\alpha$ -Ketomonokarbonsäuren beteiligt?

Untersuchungen der Insulinfreisetzung durch K. Urban an unserem Institut zeigen dass KIV, KIC und PPyr in 10 mM Konzentrationen eine deutliche Steigerung der

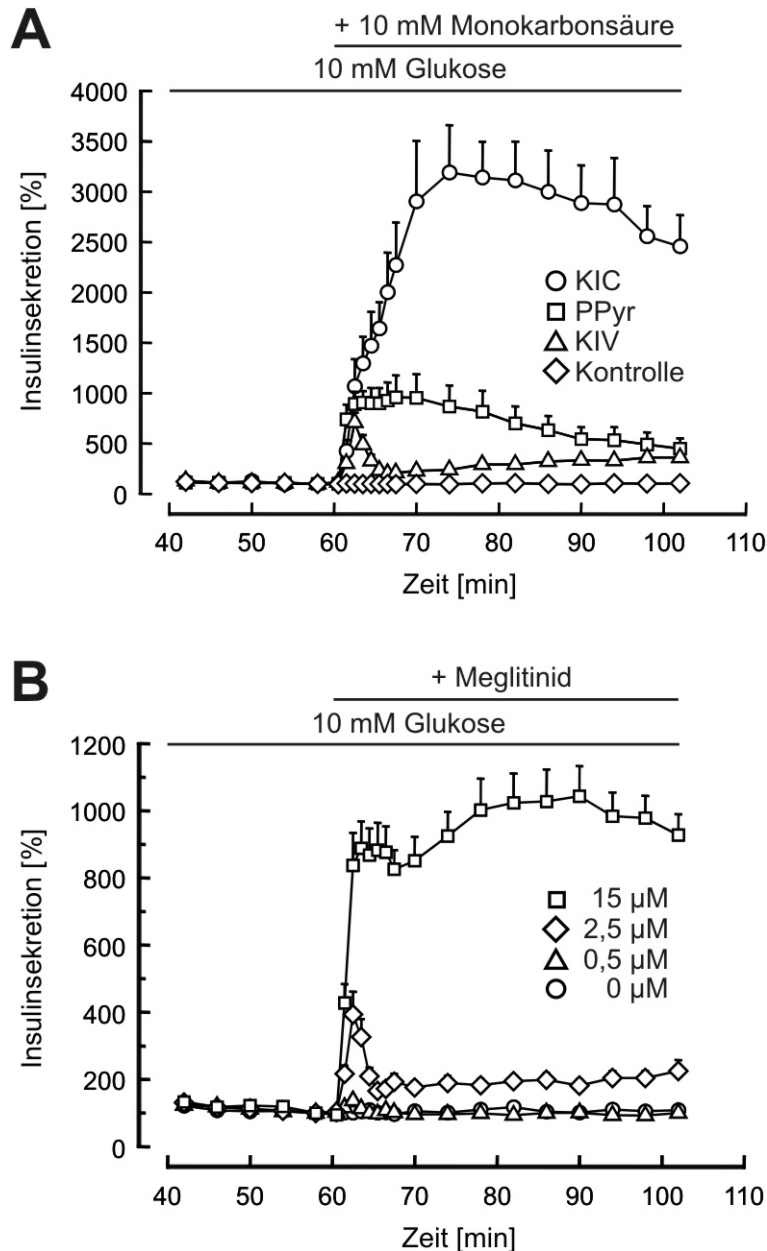


**Abb. 5.2: Wirkung von KIC, KIV und PPyr auf die pankreatische B-Zelle.** Die genannten Substanzen werden in die B-Zellen aufgenommen und metabolisiert. Die gewonnene Stoffwechselenergie führt zum Anstieg des ATP und zum Abfall des ADP im Zytosol. Diese Änderungen der Nukleotid - Konzentrationen vermindern die Offenwahrscheinlichkeit ATP-sensitiver Kaliumkanäle (1). Die daraus resultierende verminderte Kaliumleitfähigkeit der Zell-

membran führt zur Depolarisation, woraufhin sich spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen. Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration triggert die Insulinexozytose. Ohne weitere Änderung der zytosolischen Kalziumkonzentration wird die Exozytose von Insulin noch zusätzlich verstärkt, weil der mitochondriale Metabolismus Verstärker-Signale liefert, die jedoch noch nicht identifiziert sind (2). Schließlich hemmen KIC, KIV und PPyr  $K_{ATP}$ -Kanäle direkt durch Interaktion mit der Sulfonylharnstoffbindungsstelle des  $K_{ATP}$ -Kanals(3).

Insulinsekretion auslösen (Abb. 5.3 A), also in einem Konzentrationsbereich, in dem KIV die  $K_{ATP}$ -Kanäle nur schwach hemmt, KIC und PPyr jedoch eine deutliche  $K_{ATP}$ -Kanal hemmende Wirkung zeigen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Sulfonylharnstoff-Bindungsstelle und damit auch die Bindungsstelle unserer Testsubstanzen am SUR1 an der intrazellulären Seite der Zellmembran liegt (SCHWANSTECHEER et al., 1994). Wenn extrazellulär 10 mM KIC appliziert werden, beträgt die intrazelluläre Konzentration ungefähr 2 mM (HUTTON et al., 1979 b). In der Literatur liegen keine vergleichbaren Daten für KIV und PPyr vor, beide Substanzen werden jedoch wahrscheinlich mit ähnlichen Raten in Zellen transportiert (JACKSON und HALESTRAP, 1996; BRÖER et al., 1998, 1999) und auch ähnlich intensiv von B-Zellen metabolisiert wie KIC (HUTTON et al., 1979a, MALAISSE et al., 1983; LENZEN et al., 1984, 1985, 1986). Daher ist für KIV und PPyr nicht zu erwarten, dass das Verhältnis von extrazellulärer zu intrazellulärer Konzentration wesentlich anders ist als für KIC.

Somit stellt sich die Frage, ob eine 2 mM Konzentration von KIV, KIC oder PPyr durch direkte Wirkung auf die  $K_{ATP}$ -Kanäle deren Öffnungsaktivität so stark hemmt, dass dadurch Insulin aus B-Zellen freigesetzt wird. Diese Frage kann nur beantwortet werden, wenn für irgendeinen extrazellulär applizierten Hemmer der  $K_{ATP}$ -Kanäle die Beziehung zwischen Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle unter meinen Versuchsbedingungen und der Stimulation der Insulinsekretion bekannt ist. Zur Erstellung einer solchen Beziehung wurde das Sulfonylharnstoff-Analogon Meglitinid gewählt. Für Meglitinid ist bisher die Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanäle durch Binden an SUR1 als einziger Mechanismus bekannt, durch den Meglitinid die Insulinsekretion stimuliert. Dagegen setzen Sulfonylharnstoffe Insulin nicht nur durch Hemmung von  $K_{ATP}$ -Kanälen frei sondern in höheren Konzentrationen auch noch durch direkten Eingriff in den Exozytose-Mechanismus (ELIASSON et al., 1996; BARG et al., 1999; BARG, 2003). Sulfonylharnstoff-Analoga mit Benzoesäurestruktur wie Meglitinid zeigen diesen Eingriff in die Exozytose nicht (FUHLENDORFF et al., 1998). Meglitinid ist so lipophil, dass es bei physiologischem pH die Plasmamembran sehr schnell passieren kann, sodass für die wirksame freie Meglitinidkonzentration kein wesentlicher Gradient zwischen Extrazellulärraum und Zytosol zu erwarten ist. Diese Überlegung wird dadurch gestützt, dass für Meglitinid sowohl in whole-cell Clamp-Studien als auch in



**Abb. 5.3: Messung der Insulinfreisetzung durch Inselperifusion.** Maus-Pankreasinseln wurden während der gesamten Versuchsdauer in einer Perifusionsapparatur von einem Medium mit 10 mM Glukose perifundiert. Der Insulingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mittels ELISA bestimmt. Die relative Sekretionsrate bezieht sich auf die Sekretionsrate unmittelbar vor dem Wechsel zum Testmedium (Minute 58), die auf 100 % gesetzt wurde. Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 bis 6 Einzelexperimenten. Diese Perifusionsexperimente wurden von K. Urban am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig durchgeführt. **A:** Ab Minute 61 enthielt das Perifusionsmedium zusätzlich zur Glukose 10 mM KIC (○), 10 mM PPyr (□) oder 10 mM KIV (△). In Kontrollexperimenten (◇) blieb das Medium über die gesamte Versuchsdauer hinweg gleich. Alle drei Keto-säuren steigern die Insulinfreisetzung: 10 mM KIC am stärksten auf zunächst

3000 % mit einem Rückgang auf 2500 % in Minute 102. PPyr und KIV steigern beide die Sekretion am Anfang auf ca. 800 % mit einem Rückgang auf etwa 400 %, jedoch mit sehr unterschiedlicher Kinetik. In der Kontrolle blieb der Insulingehalt erwartungsgemäß bei 100%. **B:** Ab Minute 61 enthielt das Medium Meglitinid in verschiedenen Konzentrationen. 0,5 µM Meglitinid (△) im Perifusionsmedium, was einer freien Meglitinidkonzentration von 0,16 µM entspricht, beeinflusst die Insulinfreisetzung kaum. 2,5 µM Meglitinid (◇), entsprechend 0,5 µM freiem Meglitinid, verstärkt die Insulinsekretion kurzfristig auf 400 % mit einem raschen Rückgang auf 200 %, die Sekretion kann durch 15 µM Meglitinid (□) anfänglich bis auf etwa 900 % erhöht werden und erreicht nach 20 – 30 min Werte um 1000 %. Kontrollexperimente ohne Meglitinid: ○.

inside-out Patch Clamp-Studien  $EC_{50}$ -Werte um  $0,5 \mu\text{M}$  (ZÜNKLER et al., 1988; SCHWANSTECHEER et al., 1994) gefunden wurden.

Setzt man  $0,5 \mu\text{M}$  Meglitinid in Anwesenheit von  $10 \text{ mM}$  Glukose in der Inselperifusion (Experimente von K. Urban, s. Abb. 5.3 B) ein, so wird die Insulinsekretion nur unerheblich gesteigert. Diese Konzentration entspricht bei Berücksichtigung der Albuminbindung in den Perifusionsmedien einer freien Konzentration von  $0,16 \mu\text{M}$  Meglitinid, und diese blockiert in Patch Clamp-Experimenten in der inside-out Technik 20% der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanäle. Setzt man hingegen  $2,5 \mu\text{M}$  Meglitinid ein, erhöht sich die Insulinfreisetzung aus Pankreasinseln zunächst schnell auf 400 %, mit einem raschen Rückgang auf stabile 200%. Diese Konzentration entspricht einer freien Konzentration von  $0,88 \mu\text{M}$  Meglitinid, welche am inside-out Patch 50% der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanäle blockiert (SCHWANSTECHEER et al. 1994; DÖRSCHNER et al., 1999). Diese Daten zur  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalhemmung durch Meglitinid stammen genauso wie meine Daten auch aus Untersuchungen bei 20 bis  $22^\circ\text{C}$ . Eine SUR1-vermittelte  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalhemmung am inside-out Patch um 50 %, nicht aber eine Hemmung um 20 %, ist also mit einer signifikanten Stimulation der Insulinsekretion korreliert. Diese Erkenntnis wird nun auf die von mir getesteten  $\alpha$ -Ketomonokarbonsäuren angewandt: In Konzentrationen, die die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität am inside-out Patch um 20 % oder weniger senken, ist über den Mechanismus der direkten  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalhemmung keine Steigerung der Insulinsekretion zu erwarten. In Konzentrationen, die die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität um 50 % oder mehr senken, ist über den Weg der direkten  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalhemmung eine Steigerung der Insulinsekretion auf 200 % und mehr zu erwarten. Die Ergebnisse meiner Patch Clamp-Experimente an B-Zellen (Kapitel 4.2) sind für KIV, KIC und PPyr in Tabelle 5.2 zusammengefasst: 2 mM KIV reduziert die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität auf 98 %. Das reicht bei weitem nicht aus, um die Insulinfreisetzung der B-Zelle zu steigern. Die durch 10 mM KIV gesteigerte Insulinfreisetzung ist also ausschließlich Folge der durch KIV induzierten Stoffwechselaktivierung. Auch bis zu einer Konzentration von über 100 mM KIV spielt die direkte  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalhemmung wahrscheinlich keine Rolle bei der Stimulation der Insulinsekretion. 2 mM PPyr hemmt die  $K_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität um 54 %, was durch

	EC <sub>50</sub> [mM]	EC <sub>20</sub> [mM]	K <sub>ATP</sub> -Kanalaktivität bei 2 mM [%]
PPyr	1,8	0,5	46
KIC	19 *	7	95
KIV	>40	15	98

**Tab. 5.2: Hemmung der K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität durch PPyr, KIC und KIV in Patch Clamp-Experimenten im inside-out Patch an Maus-B-Zellen.** Die zugrunde liegenden Daten sind in Abb. 4.7 grafisch dargestellt. Die Spalte EC<sub>50</sub> gibt an,

welche Substanzkonzentration 50 % der K<sub>ATP</sub>-Kanäle blockiert, die Spalte EC<sub>20</sub> gibt entsprechend an, bei welcher Konzentration 20 % der Kanäle geschlossen werden. Zusätzlich ist die relative K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität bei 2 mM der jeweiligen Substanz aufgeführt.

\* Der Unterschied zum von BRÄNSTRÖM et al. (1998) ermittelten Wert (8,1 mM) ist einmal darauf zurückzuführen, dass BRÄNSTRÖM et al. (1998) die K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität in Anwesenheit von KIC auf die K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität in Anwesenheit der Kontrolllösung vor Zugabe von KIC bezogen. Dabei wurde jedoch nicht bedacht, dass die K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität mit der Versuchsdauer abnimmt (sog. Rundown). Bei der Auswertung meiner Experimente verwendete ich den Mittelwert aus der K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität während der Kontrollperioden vor und nach Zugabe der Testsubstanz als Bezugsgröße, um den Rundown zu berücksichtigen. BRÄNSTRÖM et al. (1998) haben außerdem nicht geprüft, ob die K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität unter ihren Versuchsbedingungen durch hohe KIC-Konzentrationen völlig gehemmt werden kann.

direkte K<sub>ATP</sub>-Kanalhemmung eine Steigerung der Insulinsekretion auf 200 % erwarten lässt. Tatsächlich steigert 10 mM PPyr in der Inselperfusion (Abb. 5.3 A) die Insulinsekretion zunächst auf 800 % mit einem Rückgang auf 400 % nach 45 Minuten. Ein hoher Anteil (vermutlich etwa die Hälfte) dieser  $\beta$ -zytotropen Wirkung von PPyr ist also auf die direkte K<sub>ATP</sub>-Kanalhemmung zurückzuführen, die restliche Wirkung resultiert aus der PPyr-induzierten Stoffwechselaktivierung. Schwieriger ist die Einschätzung für KIC: 2 mM KIC hemmt die K<sub>ATP</sub>-Kanalaktivität um 5 %. Dieser Wert liegt zwar unterhalb der 20 %igen K<sub>ATP</sub>-Kanalhemmung, für die noch keine Steigerung der Insulinsekretion durch direkte K<sub>ATP</sub>-Kanalhemmung zu erwarten ist. Andererseits aktiviert KIC den Energiestoffwechsel der B-Zelle viel stärker als KIV und PPyr (HASTEDT, 2002). Die daraus resultierende intensive Hemmung der K<sub>ATP</sub>-Kanäle stellt vielleicht eine Situation dar, in der auch geringgradige direkte K<sub>ATP</sub>-Kanalhemmung einen zusätzlichen Beitrag zur Stimulation der Insulinsekretion liefert.



## 6 Zusammenfassung

$\alpha$ -Ketoisocaproonsäure (kurz: KIC) ist ein wichtiges Werkzeug, um in pankreatischen B-Zellen Stoffwechselvorgänge zu identifizieren, die die Nährstoff-induzierte Insulinsekretion in Gang setzen. Ähnlich der Glukose wird auch KIC in den B-Zellen metabolisiert, aktiviert den mitochondrialen Stoffwechsel und steigert die ATP-Bildung. Dadurch wird die Aktivität ATP-empfindlicher Kaliumkanäle (kurz:  $K_{ATP}$ -Kanäle) reduziert und so die Plasmamembran depolarisiert. Dies bewirkt durch Öffnen spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle einen Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Der  $Ca^{2+}$ -Anstieg startet die Insulinsekretion. Die Insulinsekretion erreicht ihre volle Stärke aber erst dadurch, dass die Aktivierung des mitochondrialen Stoffwechsels besondere Verstärkersignale produziert. Es wurde beobachtet, dass KIC  $K_{ATP}$ -Kanäle auch direkt hemmt. Diese direkte Wirkung sollte in meiner Arbeit genauer charakterisiert werden. Weiter sollte untersucht werden, welche anderen mit KIC strukturell verwandten Monokarbonsäuren ebenfalls  $K_{ATP}$ -Kanäle direkt hemmen. Schließlich sollte geprüft werden, ob direkte Wirkungen am Insulin-freisetzenden Effekt von KIC und verwandten Substanzen beteiligt sind.

Die Wirkungen von KIC,  $\alpha$ -Ketocapronat (KC), Isocapronat (IC),  $\alpha$ -Ketoisovalerat (KIV),  $\beta$ -Phenylpyruvat (PPyr) und  $\beta$ -Phenylpropionat (PProp) auf die Kanalaktivität transient in COS-Zellen exprimierter  $K_{ATP}$ -Kanäle vom  $K_{IR6.2}/SUR1$ -Typ wurde in Patch Clamp-Experimenten am inside-out Patch untersucht. In meinen Versuchen beeinflussten 20 mM-Konzentrationen der KIC-, KIV- und PPyr-Anionen die Einzelkanalleitfähigkeit der Kanäle vom  $K_{IR6.2}/SUR1$ -Typ nicht. Jedoch wurde die Öffnungsaktivität dieser Kanäle durch alle getesteten Monokarbonsäuren vermindert. Bei Einsatz in 20 mM-Konzentrationen nahm die Hemmwirkung der getesteten Substanzen in folgender Reihenfolge zu:  $KIV < KIC = KC = IC < PPyr < PProp$ . Kontrollexperimente mit dem sehr potenten Sulfonylharnstoff-Analogon Meglitinid in maximal-wirksamer Konzentration zeigten, dass unter meinen Versuchsbedingungen durch Testsubstanzen, die am Sulfonylharnstoffrezeptor-Subtyp SUR1 angreifen, keine vollständige Unterdrückung der Öffnungsaktivität von  $K_{ATP}$ -Kanälen erreicht werden konnte.

In Patch Clamp-Experimenten an inside-out Patches von Maus-B-Zellen wurde für KIV, KIC, KC und PPyr die Abhängigkeit der  $K_{ATP}$ -Kanal-Hemmung von den Konzentrationen der Testsubstanzen untersucht. Diese Versuche wurden, anders als

es bei den Experimenten mit den in COS-Zellen exprimierten  $K_{ATP}$ -Kanälen der Fall war, in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und ADP in der intrazellulären Lösung durchgeführt. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass unter solchen Versuchsbedingungen Substanzen, die an SUR1 angreifen (z.B. Sulfonylharnstoffe oder Meglitinid), in maximal-wirksamen Konzentrationen eine völlige Hemmung der Öffnungsaktivität nativer  $K_{ATP}$ -Kanäle bewirken. Dies wurde von mir mit Meglitinid bestätigt. Damit waren die Voraussetzungen gegeben, um Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für die Hemmung von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch Monokarbonsäuren zu erstellen. Auch unter diesen Versuchsbedingungen beobachtete ich keinen Einfluss von Monokarbonsäure-Anionen auf die Einzelkanalleitfähigkeit der nativen  $K_{ATP}$ -Kanäle. Für KIV, KIC, KC und PPyr wurden folgende halbmaximal-wirksame Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) ermittelt: > 40 mM, 18,9 mM, 12,5 mM und 1,8 mM.

Bindungsexperimente, die am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig durchgeführt wurden, zeigen, dass meine Testsubstanzen an die regulatorische Untereinheit SUR1 des  $K_{ATP}$ -Kanals der B-Zelle binden. Es ist ferner bekannt, dass KIC die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität von  $K_{IR6.2\Delta 26}$ - $K_{ATP}$ -Kanälen, also  $K_{ATP}$ -Kanälen ohne SUR-Untereinheit, nicht hemmt. Somit hemmen die von mir untersuchten Monokarbonsäuren die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch Interaktion mit der SUR1-Untereinheit des  $K_{ATP}$ -Kanals.

Da KIC, KC und IC sich in ihrer  $K_{ATP}$ -Kanal-hemmenden Wirksamkeit kaum unterscheiden, sind eine  $\alpha$ -ständige Ketogruppe sowie eine Verzweigung der Kohlenstoffkette für die Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität nicht relevant. Die Zunahme der Wirkpotenz ( $1/EC_{50}$ ) in der Reihenfolge  $KIV < KIC < PPyr$  zeigt, dass eine Monokarbonsäure um so potenter ist, je lipophiler sie ist.

Das Sulfonylharnstoff-Analogon Meglitinid steigert die Insulinsekretion pankreatischer B-Zellen ausschließlich durch direkte Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität. Es ist bekannt, dass eine Meglitinidkonzentration, die am inside-out Patch eine 20 %ige Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität bewirkt, die durch 10 mM Glukose induzierte Insulinsekretion nicht steigert. Dagegen ist eine 50 %ige Hemmung der  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität durch Meglitinid mit einer Verdopplung der Insulinsekretionsrate korreliert. Es ist ferner bekannt, dass eine extrazelluläre Applikation von 10 mM (entspricht etwa 2 mM intrazellulär) KIV, PPyr oder KIC die durch 10 mM Glukose induzierte Insulinsekretion 4fach, 4fach bzw. 25fach steigert. Da 2 mM KIV an der

intrazellulären Seite der Plasmamembran nur eine minimale  $K_{ATP}$ -Kanal-Hemmung bewirkte, spielt die direkte  $K_{ATP}$ -Kanal-Hemmung keine Rolle bei der KIV-induzierten Insulinsekretion. Dagegen hemmte 2 mM PPyr um etwa 50 %, sodass die direkte  $K_{ATP}$ -Kanal-Hemmung einen beträchtlichen Beitrag zur PPyr-induzierten Insulinsekretion liefert. 2 mM KIC hemmte die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität um etwa 5 %. Dies alleine lässt keine Steigerung der Insulinsekretion durch direkte  $K_{ATP}$ -Kanalhemmung erwarten. KIC aktiviert den Energiestoffwechsel der B-Zelle aber viel stärker als KIV und PPyr. Dies könnte Bedingungen schaffen, unter denen auch eine geringgradige direkte  $K_{ATP}$ -Kanalhemmung einen Beitrag zur Stimulation der Insulinsekretion liefert.

## Literatur

- AGERSO H, JENSEN LB, ELBROND B, ROLAN P, ZDRAVKOVIC M 2002: The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men, *Diabetologia* 45(2):195-202
- AGUILAR-BRYAN L, NICHOLS CG, WECHSLER SW, CLEMENT JP 4TH, BOYD AE 3RD, GONZALEZ G, HERRERA-SOSA H, NGUY K, BRYAN J, NELSON DA., 1995: Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion, *Science* 268(5209):423-6
- ALBERTI KG, ZIMMET PZ, 1998b: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation, *Diabet Med.* 15(7):539-53
- ASPLUND K, WIHOLM BE, LITHNER F, 1983 : Glibenclamide-associated hypoglycaemia: a report on 57 cases, *Diabetologia* 24(6):412-7
- ASHCROFT FM, HARRISON DE, ASHCROFT SJ, 1984: Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells, *Nature* 312(5993):446-448
- ASHCROFT FM, ASHCROFT SJ, HARRISON DE, 1987: Effects of 2-ketoisocaproate on insulin release and single potassium channel activity in dispersed rat pancreatic beta-cells, *J Physiol.* 385:517-29
- ASHCROFT FM und RORSMAN P, 1989: Electrophysiology of the pancreatic beta-cell, *Prog Biophys Mol Biol.* 54(2):87-143
- ASHCROFT SJ, WEERASINGHE LC, RANDLE PJ, 1973 : Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release, *Biochem J.* 132(2):223-31
- ASHCROFT SJ, ASHCROFT FM, 1990: Properties and functions of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Cell signal* 2:197-214
- ASPLUND K, WIHOLM BE, LITHNER F, 1983: Glibenclamide-associated hypoglycaemia: a report on 57 cases, *Diabetologia* 24(6):412-7
- BABENKO AP, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J, 1998: A view of sur/KIR6.X, KATP channels, *Annu Rev Physiol.* 60:667-87
- BARG S, 2003: Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells, *Pharmacol Toxicol.* 92(1):3-13
- BARG S, GALVANOVSKIS J, GÖPEL S O, RORSMAN P, ELIASSEN L, 2000: Tight Coupling Between Electrical Activity and Exocytosis in Mouse Glucagon-Secreting  $\alpha$ -cells. *Diabetes* 49:1500-1510

- BARG S, RENSTROM E, BERGGREN PO, BERTORELLO A, BOKVIST K, BRAUN M, ELIASSON L, HOLMES WE, KOHLER M, RORSMAN P, THEVENOD F, 1999: The stimulatory action of tolbutamide on Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in pancreatic beta cells is mediated by a 65-kDa mdv-like P-glycoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5539-44
- BELL GI, SANCHEZ-PESCADOR R, LAYBOURN PJ, NAJARIAN RC, 1983: Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene, *Nature* 304:368-371
- BENNET JP, 1978: Methods in binding studies. *Neurotransmitter Receptor Binding*; hrsg. v. Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ. Raven Press, New York 57-90
- BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L, 2002: *Biochemistry*, hrsg. v. Bedforth, Freeman & Worth, New York, 5.Auflage: Kap. 16.2
- BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L, 2002: *Biochemistry*, hrsg. v. Bedforth, Freeman & Worth, New York, 5.Auflage: Kap. 18
- BERGER W, 1990: Rationale Grundlagen der Insulintherapie, *Akt Endokr Stoffw* 11:203-211
- BODEN G, 1997: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM, *Diabetes* 46(1):3-10
- BOLLENSDORFF C, KNOPP A, BISKUP C, ZIMMER T, BENNDORF K, 2003: Na<sup>+</sup> current through KATP channels: consequences for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> fluxes during early myocardial ischemia, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Epub ahead of print]
- BRÄNSTRÖM R, EFENDIC S, BERGGREN PO, LARSSON O, 1998: Direct inhibition of the pancreatic beta-cell ATP-regulated potassium channel by alpha-ketoisocaproate, *J Biol Chem.* 273(23):14113-8
- BROER S, SCHNEIDER HP, BROER A, RAHMAN B, HAMPRECHT B, DEITMER JW, 1998: Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH, *Biochem J.* 333 ( Pt 1):167-74
- BROER S, BROER A, SCHNEIDER HP, STEGEN C, HALESTRAP AP, DEITMER JW, 1999: Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes, *Biochem J.* 341 ( Pt 3):529-35
- BRÜCKEL J, KÖBBERLING J, 2002: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes Mellitus, *Diabetes und Stoffwechsel* 11(2):6
- CAHILL GF Jr, 1988: Beta-cell deficiency, insulin resistance, or both? *N Engl J Med.* 318(19):1268-70
- CHENG Y, PRUSOFF WH, 1973: Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction, *Biochem Pharmacol.* 22(23):3099-108

- COLQUHOUN D, SIGWORTH FJ, 1995: Fitting and statistical analysis of single-channel records, *Singel Channel Recording*; hrsg. Sakmann B, Neher E; Plenum Press, New York, London, 499-501
- COOK DL, HALES CN, 1984: Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells, *Nature* 311(5983):271-3
- CREUTZFELD W, 1979, The incretin concept today, *Diabetologia* 16: 75-85
- DEACON CF, JOHNSEN AH, HOLST JJ, 1995: Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo, *J Clin Endocrinol Metab* 80(3):952-7
- DEAN PM, MATTHEWS EK, 1968: Electrical activity in pancreatic islet cells, *Nature* 219(5152):389-90
- DÖRSCHNER H, BREKARDIN E, UHDE I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M, 1999: Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure, *Mol Pharmacol.* 55(6):1060-6
- DUNNE MJ, PETERSEN OH, 1986: Intracellular ADP activates K<sup>+</sup> channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line, *FEBS Lett.* 208(1):59-62
- EFENDIC S, ENZMANN F, NYLEN A, UVNAS-WALLENSTEN K, LUFT R, 1979: Effect of glucose/sulfonylurea interaction on release of insulin, glucagon, and somatostatin from isolated perfused rat pancreas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(11):5901-4
- EISSELE R, GÖKE R, WILLEMER S, HARTHUS HP, VERMEER H, ARNOLD R, GÖKE B, 1992: Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man, *Eur J Clin Invest* 22(4):283-91
- ELIASSEN L, RENSTROM E, AMMALA C, BERGGREN PO, BERTORELLO AM, BOKVIST K, CHIBALIN A, DEENEY JT, FLATT PR, GABEL J, GROMADA J, LARSSON O, LINDSTROM P, RHODES CJ, RORSMAN P, 1996: PKC-dependent stimulation of exocytosis by sulfonylureas in pancreatic beta cells, *Science* 271(5250):813-5
- EXPERT COMMITTEE 1997: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 20(7):1183-97
- FEHMANN H-C, GÖKE R AND GÖKE B, 1995: Cell and molecular biology of the incretin hormones Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrine Reviews* 16:390-410
- FERNER RE, NEIL HA, 1988: Sulphonylureas and hypoglycaemia, *Br Med J (Clin Res Ed)* 296(6627):949-50
- FERRANNINI E, 1998: Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects, *Endocr Rev.* 19(4):477-90

- FÖLSCH UR, LEMBCKE B, 1991: Inhibition der intestinalen Alpha-Glukosidasen in der Therapie des Diabetes mellitus, *Internist* 32:699-707
- FLINT A, RABEN A, ASTRUP A, HOLST JJ, 1998: Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans, *J Clin Invest* 101(3):515-20
- FUHELENDORFF J, RORSMAN P, KOFOOD H, BRAND CL, ROLIN B, MACKAY P, SHYMKO R, CARR RD, 1998: Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes, *Diabetes* 47(3):345-51
- GEMBAL M, GILON P, HENQUIN JC, 1992: Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells, *J Clin Invest.* 89(4):1288-95
- GEPTS W, CHRISTOPHE J, MAYER J, 1960: Pancreatic Islets in Mice with the Obese-hyperglycemic Syndrome, *Diabetes* 9(1):63-69
- GERICH JE, 1998: The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity, *Endocr Rev.* 19(4):491-503
- GLUZMAN 1981: SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants, *Cell* 23(1):175-82
- GOPALAKRISHNAN M, JOHNSON DE, JANIS RA, TRIGGLE DJ, 1998: Characterization of binding of the ATP-sensitive potassium channel ligand, [3H]glyburide, to neuronal and muscle preparations, *J Pharmacol Exp Ther.* 257(3):1162-71
- GORUS FK, SCHUIT FC, IN'T VELD PA, GEPTS W, PIPELEERS DG, 1988: Interaction of sulfonylureas with pancreatic beta-cells. A study with glyburide, *Diabetes* 37(8):1090-5
- GREGORIO F, AMBROSI F, CRISTALLINI S, PEDETTI M, FILIPPONI P, SANTEUSANIO F, 1992: Therapeutical concentrations of tolbutamide, glibenclamide, gliclazide and gliquidone at different glucose levels: in vitro effects on pancreatic A- and B-cell function, *Diabetes Res Clin Pract* 18(3):197-206
- GROSS I, 2000 : Aktivierung rekombinanter KATP-Kanäle durch Kalium-Kanal-Öffner und Nukleosiddiphosphate, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig
- HÄRING H U, JOOST H-G, LAUBE H, MATTHEI S, MEISSNER H-P, PANTEN U, SCHERNTHANER G, 2002: Behandlung des Typ 2 Diabetes, *Diabetes und Stoffwechsel* 11(2):9-13
- HAMBROCK A, LOFFLER-WALZ C, KURACHI Y, QUAST U, 1998: Mg<sup>2+</sup> and ATP dependence of K(ATP) channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B, *Br J Pharmacol.* 125(3):577-83
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ, 1981: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflugers Arch.* 391(2):85-100

- HAUNER H, 1998: Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland, *Dtsch Med Wschr* 123:777-782
- HASSELBLATT A, PANTEN U, 2001: Glucosestoffwechsel. Insuline; oral wirksame, blutzuckersenkende Arzneimittel. Therapie des Diabetes mellitus. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; hrsg. v. Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 8:649-670
- HASTEDT K, 2002: Mechanismus der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Wirkung  $\beta$ -zytotoxischer Nährstoffe und Interaktion neuer Sulfonylharnstoff-analoga mit  $K_{ATP}$ -Kanälen, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig
- HEDESKOV CJ, 1980: Mechanism of glucose-induced insulin secretion, *Physiol Rev* 60(2):442-509
- HELLMAN B, 1965: Studies in obese-hyperglycemic Mice, *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 131: 541-558
- HENQUIN JC, MEISSNER HP, 1981: Effects of amino acids on membrane potential and  $86Rb^+$  fluxes in pancreatic beta-cells, *Am J Physiol.* 240(3):E245-52
- HENQUIN JC, 1987: Regulation of insulin release by ionic and electrical events in B cells, *Horm Res.* 27(3):168-78
- HENQUIN JC, 2000: Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose, *Diabetes* 49(11):1751-60
- HOLST JJ, 2003: Implementation of GLP-1 based therapy of type 2 diabetes mellitus using DPP-IV inhibitors, *Adv Exp Med Biol* 524:263-79
- HORIE M, IRISAWA H, AND NOMA A, 1987: Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol (Lond)* 387:251-272
- HOWELL SL, TAYLOR KW, 1966: Effects of glucose concentration on incorporation of  $[3H]$ leucine into insulin using isolated mammalian islets of Langerhans, *Biochim Biophys Acta* 130(2):519-21
- HUTTON JC, SENER A, MALAISSE WJ, 1979 a: The metabolism of 4-methyl-2-oxopentanoate in rat pancreatic islets *Biochem J.* 184(2):291-301
- HUTTON JC, SENER A, MALAISSE WJ, 1979 b: The stimulus-secretion coupling 4-methyl-2-oxopentanoate-induced insulin release *Biochem J.* 184(2):303-11
- HUTTON JC, SENER A, HERCHUELZ A, ATWATER I, KAWAZU S, BOSCHERO AC, SOMERS G, DEVIS G, MALAISSE WJ, 1980: Similarities in the stimulus-secretion coupling mechanisms of glucose- and 2-keto acid-induced insulin release, *Endocrinology* 106(1):203-19



- HUTTON JC, SENER A, MALAISSE WJ, 1980: Interaction of branched chain amino acids and keto acids upon pancreatic islet metabolism and insulin secretion, *J Biol Chem.* 255(15):7340-6
- INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP 4TH, NAMBA N, INAZAWA J, GONZALEZ G, AGUILAR-BRYAN L, SEINO S, BRYAN J, 1995: Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor, *Science.* 270(5239):1166-70
- INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP, WANG CZ, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J, SEINO S, 1996: A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels, *Neuron.* 16(5):1011-7
- ISOMOTO S, KONDO C, YAMADA M, MATSUMOTO S, HIGASHIGUCHI O, HORIO Y, MATSUZAWA Y, KURACHI Y, 1996: A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel. *J Biol Chem* 271: 24321-24324
- JACKSON VN, HALESTRAP AP, 1996: The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxy-fluorescein, *J Biol Chem.* 271(2):861-8
- JANKA HU, REDAELLI M, GANDJOUR A, GIANI G, HAUNER H, MICHAELIS D, STANDL E, 2000: Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. In: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG; hrsg: Scherbaum WA, Lauterbach KW, Renner R; Deutsche Diabetes Gesellschaft, Düsseldorf, 1:13-30
- KAKEI M, NOMA A, SHIBASAKI T, 1985: Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol (Lond)* 363:441-462
- KERNER W, 1998: Klassifikation und Diagnose des Diabetes mellitus. *Deutsches Ärzteblatt*, 49:B2434-B2438
- KREYMANN B, WILLIAMS G, GHATEI MA, BLOOM SR, 1987: Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet* Dec 5;2(8571):1300-4
- LACY PE, KOSTIANOVSKY M, 1967: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas, *Diabetes* 16(1):35-9
- LANDGRAF R, 2000: Meglitinide analogues in the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Drugs Aging* 17(5):411-25
- LAZDUNSKI M, 1996: Ion channel effects of antidiabetic sulfonylureas. *Horm Metab Res* 28: 488-495
- LENZEN S & PANTEN U, 1980: 2-oxocarboxylic acids and function of pancreatic islets in obese-hyperglycaemic mice. Insulin secretion in relation to <sup>45</sup>Ca uptake and metabolism, *Biochem J.* 186(1):135-44

- LENZEN S, FORMANEK H, PANTEN U, 1982: Signal function of metabolism of neutral amino acids and 2-keto acids for initiation of insulin secretion. *J Biol Chem* 257: 6631-6633
- LENZEN S, RUSTENBECK I, PANTEN U, 1984: Transamination of 3-phenylpyruvate in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* 259: 2043-2046
- LENZEN S, SCHMIDT W, PANTEN U, 1985: Transamination of neutral amino acids and 2-keto acids in pancreatic B-cell mitochondria. *J Biol Chem* 260: 12629-12634
- LENZEN S, SCHMIDT W, RUSTENBECK I, PANTEN U, 1986: 2-ketoglutarate generation in pancreatic B-cell mitochondria regulates insulin secretory action of amino acids and 2-keto acids, *Biosci Rep.* 6(2):163-9
- LERNMARK, 1974: The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets, *Diabetologia* 10(5):431-8
- LIU YJ, HELLMAN B, GYLFE E, 1999: Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse pancreatic polypeptide cells. *Endocrinology* 140(12):5524-9
- MALAISSÉ WJ, SENER A, WELSH M, MALAISSÉ-LAGAE F, HELLERSTROM C, CHRISTOPHE J, 1983: Mechanism of 3-phenylpyruvate-induced insulin release. Metabolic aspects, *Biochem J.* 210(3):921-7
- MATTHEWS DR, CULL CA, STRATTON IM, HOLMAN RR, TURNER RC, 1998: UKPDS 26: Sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, *Diabet Med* 15(4):297-303
- MATTHEWS EK, 1985: Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cells. In: *The Electrophysiology of the Secretory Cell*; hrsg. v. Poisner AM, Trifaro JM; Elsevier, Amsterdam: 93-112
- MCCLENAGHAN NH, FLATT PR, 2000: Metabolic and K(ATP) channel-independent actions of keto acid initiators of insulin secretion, *Pancreas.* 20(1):38-46
- MEYER M, 1999 : Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Interaktion von blutzuckersenkend wirkenden Sulfonylharnstoffen und Analoga mit den Sulfonylharnstoffrezeptor-Subtypen SUR1, SUR2A und SUR2B, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig
- MORRIS GE, KORNER A, 1970: The effect of glucose on insulin biosynthesis by isolated islets of Langerhans of the rat, *Biochim Biophys Acta* 208(3):404-13
- MORRIS GE, KORNER A, 1970: RNA synthesis and the stimulation of insulin biosynthesis by glucose, *FEBS Lett* 10(3):165-168
- MOSKALEWSKI S, 1965: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen comp Endocr* 5: 342-353

- NAUCK MA, KLEINE N, ORSKOV C, HOLST JJ, WILLMS B, CREUTZFELDT W, 1993: Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients, *Diabetologia* 36(8):741-4
- NAUCK MA, WOLLSCHLAGER D, WERNER J, HOLST JJ, ORSKOV C, CREUTZFELDT W, WILLMS B, 1996: Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM, *Diabetologia* 39(12):1546-53
- NAUCK MA, NIEDEREICHHOLZ U, ETTLER R, HOLST JJ, ORSKOV C, RITZEL R, SCHMIEGEL WH, 1997: Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans, *Am J Physiol* 273(5 Pt 1):E981-8
- NAUCK MA, SAUERWALD A, RITZEL R, HOLST JJ, SCHMIEGEL W, 1998: Influence of glucagon-like peptide 1 on fasting glycemia in type 2 diabetic patients treated with insulin after sulfonylurea secondary failure, *Diabetes Care* 21(11):1925-31
- ORSKOV C, HOLST JJ, NIELSEN OV, 1988: Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach, *Endocrinology* 123(4):2009-13
- PANTEN U, KRIEGSTEIN E, POSER W, SCHONBORN J, HASSELBLATT A, 1972: Effects of L-leucine and alpha-ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets, *FEBS Letters* 20(2), 225-228
- PANTEN U, 1975: Effects of alpha-ketomonocarboxylic acids upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 291(4):405-20
- PANTEN U, ISHIDA H, SCHAUDER P, FRERICHS H, HASSELBLATT A, 1977: A versatile microperfusion system, *Anal Biochem* 82(2):317-26
- PANTEN U, BIERMANN J, GRAEN W, 1981: Recognition of insulin-releasing fuels by pancreatic B-cells: alpha-ketoisocaproic acid is an appropriate model compound to study the role of B-cell metabolism, *Mol Pharmacol.* 20(1):76-82
- PANTEN U, ZIELMANN S, JOOST H-G, LENZEN S, 1984: Branched chain amino and keto acids - tools for the investigation of fuel recognition mechanism in pancreatic B-cells. In: *Branched chain amino and keto acids in health and disease*; hrsg. v. Adibi SA, Fekl W, Langenbeck U, Schauder P. Karger Verlag, Basel: 134-146
- PANTEN U, ZÜNKLER BJ, SCHEIT S, KIRCHHOFF K, LENZEN S, 1986: Regulation of energy metabolism in pancreatic islets by glucose and tolbutamide, *Diabetologia* 29(9):648-54
- PANTEN U 1987: Rapid control of insulin secretion from pancreatic islets. *ISI Atlas Sci: Pharmacol* 1: 307-310

- PANTEN U, SCHWANSTECHE M, WALLASCH A, LENZEN S, 1988: Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 338: 459-462
- PANTEN U, SCHWANSTECHE M, SCHWANSTECHE C, 1996: Mode of action of sulfonylureas, *Handbook of experimental pharmacology, Oral antidiabetics*; hrsg. v. Kuhlmann J, Puls W. Springer-Verlag Berlin; 119:129-159
- PARRY DG, TAYLOR KW, 1966: The effects of sugars on incorporation of [3H]leucine into insulins, *Biochem J* 100(1):2C-4C
- PETERS AL, DAVIDSON MB, 1990: Use of sulfonylurea agents in older diabetic patients, *Clin Geriatr Med.* 6(4):903-21
- PROKS P, ASHCROFT FM, 1997: Phentolamine block of  $K_{ATP}$  channels is mediated by Kir6.2, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(21):11716-20
- QESADA I, NADAL A, SORIA B, 1999: Different Effects of Tolbutamide and Diazoxide in  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\delta$ -Cells Within Intact Islets of Langerhans. *Diabetes* 48: 2390-2397
- REPKE H, LIEBMANN C, 1987: Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- RIBALET B, EDDLESTONE GT, CIANI S, 1988: Metabolic regulation of the K(ATP) and a maxi-K(V) channel in the insulin-secreting RINm5F cell, *J Gen Physiol.* 92(2):219-37
- RORSMAN P, TRUBE G, 1985: Glucose dependent  $K^+$ -channels in pancreatic beta-cells are regulated by intracellular ATP, *Pflugers Arch.* 405(4):305-9
- RUSTENBECK I, DICKEL C, HERRMANN C ET GRIMMSMANN T, 1999: Mitochondria Present in Excised Patches From Pancreatic B-cells May Form Microcompartments With ATP-Dependent Potassium Channels. *Bioscience Reports* 19(2): 89-98
- SAKMANN B, NEHER E, 1983: Geometric Parameters of Pipettes and Membrane Patches, *Singel Channel Recording*; hrsg. Sakmann B, Neher E; Plenum Press, New York, London, 37-51
- SANTERRE RF, COOK RA, CRISEL RM, SHARP JD, SCHMIDT RJ, WILLIAMS DC, WILSON CP, 1981: Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(7):4339-43
- SATO Y, AIZAWA T, KOMATSU M, OKADA N, YAMADA T, 1992 : Dual functional role of membrane depolarization/ $Ca^{2+}$  influx in rat pancreatic B-cell, *Diabetes* 41(4):438-43
- SCHATZ H, MAIER V, HINZ M, NIERLE C, PFEIFFER EF, 1972: The effect of tolbutamide and glibenclamide on the incorporation of ( 3 H)leucine and on the conversion of proinsulin to insulin in isolated pancreatic islets, *FEBS Lett* 26(1):237-40

- SCHMELING H, ZÜNKLER BJ, PANTEN, U:  $\alpha$ -Keto-monocarboxylic acids directly inhibit ATP-sensitive  $K^+$ -channels (Kurzvortrag). *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 110(Suppl. 1): S2, V005. 46. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Göttingen, Februar-März 2002.
- SCHUIT FC, HUYPENS P, HEIMBERG H, PIPELEERS DG, 2001: Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus, *Diabetes* 50(1):1-11
- SCHWANS M, SCHWANSTECHER C, DICKEL C, CHUDZIAK F, MOSHIRI A, PANTEN U, 1994: Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the beta-cell membrane, *Br J Pharmacol.* 113(3):903-11
- SCHWANSTECHER M, SIEVERDING C, DÖRSCHNER H, GROSS I, AGUILAR-BRYAN L, SCHWANSTECHER C, BRYAN J 1998: Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* 17: 5529-5535
- SCHWAPPACH B, ZERANGUE N, JAN YN ET JAN LY, 1998: The last 36 Amino acids of KIR 6.2 block surface expression. 2<sup>nd</sup> international Conference on ATP-sensitive Potassium Channels and Disease, St. Charles, Illinois.
- SIEVERDING AH, 1998: Regulation der hochaffinen Bindung von Sulfonylharnstoffen an SUR1 durch Nucleotide und Nucleotidanaloga, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig
- SPIEGELMAN BM, 1998: PPAR $\gamma$ : Adipogenic Regulator and Thiazolidinedione Receptor, *Diabetes* 47:507-514
- STURGESS NC, ASHFORD MLJ, COOK DL, HALES CN, 1985: The sulfonylurea receptor may be an ATP-sensitive  $K^+$  channel. *Lancet* 2: 474–475
- THORENS B, SARKAR HK, KABACK HR, LODISH HF, 1988: Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells, *Cell* 55(2):281-90
- TRUBE G, RORSMAN P, OHNO-SHOSAKU T, 1986: Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent  $K^+$ -channel in mouse pancreatic B-cell. *Pflügers Arch* 407: 493–499
- TUCKER SJ, GRIBBLE FM, ZHAO C, TRAPPS S ET ASHCROFT FM, 1997: Truncation of Kir 6.2 produces ATP-sensitive  $K^+$ -channels in the absence of the sulfonyl urea receptor. *Nature* 387: 179-183
- Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatei MA, Herbert J, Bloom SR (1996) : A ROLE FOR GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 IN THE CENTRAL REGULATION OF FEEDING, *NATURE* 379(6560):69-72

- UKPDS Group. Prospective Diabetes Study 33 (1998): Intensive blood-glucose control with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes, *Lancet* 352:837-853
- UKPDS Group. Prospective Diabetes Study 34 (1998): Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes, *Lancet* 352:854-865
- VAN STAAL T, ABENHAIM L, MONETTE J, 1997: Rates of hypoglycemia in users of sulfonylureas, *J Clin Epidemiol* 50(6):735-41
- VILSBOLL T, KRARUP T, MADSBAD S, HOLST JJ, 2002: Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients, *Diabetologia* 1111-9. Epub 2002 Jul 04
- WALLENSTEIN S, ZUCKLER CL, FLEISS JL, 1980: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47: 1-9
- WETTERGREN A, SCHJOLDAGER B, MORTENSEN PE, MYHRE J, CHRISTIANSEN J, HOLST JJ, 1993: Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man, *Dig Dis Sci* 38(4):665-73
- WIDMANN C, BURKI E, DOLCI W, THORENS B, 1994: Signal transduction by the cloned glucagon-like peptide-1 receptor: comparison with signaling by the endogenous receptors of beta cell lines, *Mol Pharmacol* 45(5):1029-35
- WOLLEN N, BAILEY CJ, 1988 a: Metformin potentiates the antigluconeogenic action of insulin. *Diabetes Metab.* 14(2):88-91
- WOLLEN N, BAILEY CJ, 1988 b: Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. Synergism with insulin. *Biochem Pharmacol* 37: 4353-4358
- YAMADA M, ISOMOTO S, MATSUMOTO S, KONDO C, SHINDO T, HORIO Y, KURACHI Y, 1997: Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel, *J Physiol.* 499 ( Pt 3):715-20
- ZÜNKLER BJ, LENZEN S, MANNER K, PANTEN U, TRUBE G 1988: Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K<sup>+</sup> currents in pancreatic B-cells, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 337(2):225-30

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCKA-DH	Branched-chain keto acid-dehydrogenase (Verzweigketten-Ketosäuren-Dehydrogenase)
cAMP	cyclisches Adenosin-5'-monophosphat
CCK	Cholecystokinin
COS	CV, Origin of SV40 (s.3.1)
CV-1	Permanente Nierenzelllinie afrikanischer grüner Meerkatzen
DAG	Diacylglycerol
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMEM	Dulbecco modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
EC <sub>50</sub>	halbmaximal-wirksame Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure#
EGTA	Ethylenglykol-bis.(2-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EZ	extrazelluläre Lösung
Fa.	Firma
FCS	fetal Calf Serum, fötales Kälberserum
GIP	Gastric Inhibitory Peptide
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
GRP	Gastrin-releasing Peptide
h	Stunde
<sup>3</sup> H	Tritium, Isotop des Wasserstoffs
HBS	HEPES Buffered Saline solution
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HIT	hamster insulinoma tumor cell
Hz	Hertz
IC	Isocaproinsäure
IP <sub>3</sub>	Inositol-tris-phosphat
IZ	intrazelluläre Lösung
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>IR</sub>	einwärtsgleichrichtender (Inward rectifying) Kaliumkanal
KC	α-Ketocaproinsäure
KIC	α-Ketoisocaproinsäure
KIV	α-Ketoisovaleriansäure
l	Liter
M	molar; mol/Liter
mg	Milligramm; 10 <sup>-3</sup> g
μg	Mikrogramm; 10 <sup>-6</sup> g
ml	Milliliter; 10 <sup>-3</sup> l
μl	Mikroliter; 10 <sup>-6</sup> l

mM	millimolar, $10^{-3}$ mol/Liter
$\mu$ M	mikromolar, $10^{-6}$ mol/Liter
min	Minute
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
$M_r$	Molekulargewicht
n	Stoffmenge
n.g.	nicht gemessen
NMRI	Naval Medical Research Institute (USA)
P1075	N-Cyano-N'-(1,1-dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
pA	Pikoampère; $10^{-12}$ Ampère
p.A.	pro Analyse
PBS	Phosphatpufferlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	Phosphokinase A
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Pankreatisches Polypeptid
PPAR $\gamma$	peroxisome-proliferator-aktiviert receptor- $\gamma$
PProp	$\beta$ -Phenylpropionat, Hydrozimtsäure
PPyr	$\beta$ -Phenylpyruvat
ppm	parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (USA)
s	Sekunde
SEM	Standartabweichung der Mittelwerte
sog.	sogenannt
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor
SV	Simian Virus
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Lösung
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
Upm	Umdrehungen pro Minute
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
w/v	Massenanteil pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel





## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Henrike Mathilde Schmeling  
Geburtstag: 22. November 1974  
Geburtsort: Herford  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Schule**

1981 - 1985 Grundschole Enger-Mitte  
1985 - 1994 Widukind-Gymnasium Enger  
Juni 1994 Allgemeine Hochschulreife

### **Studium und Ausbildung**

Okt. 1994 - Nov. 1998 TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG  
Studium der Pharmazie  
Sept. 1996 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Nov. 1998 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Dez. 1998 - Mai 1999 HIRSCH-APOTHEKE OSNABRÜCK  
Pharmaziepraktikum  
Juni 1999 - Nov. 1999 GEMEINSCHAFTSKRANKENHAUS HERDECKE  
Pharmaziepraktikum  
Dez. 1999 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Approbation als Apothekerin

### **Berufstätigkeit**

Jan. 2000 – Dez. 2003 TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie  
und Toxikologie  
seit Januar 2004 RATIOPHARM GmbH  
Fachreferentin für Arzneimittelinformation